

EL FACTOR REPROGRAMADOR EMBRIONARIO Lin28a ESTÁ SOBREEXPRESADO EN LA LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA A TRAVÉS DE MECANISMOS GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS QUE AFECTAN A LA FAMILIA hsa-miR-9

V. Martín Palanco, M.V. García Ortiz, C. Cerrato, M. Muñoz-Calero, A. Torres, J. Román-Gómez

Unidad de Hematología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

Introducción: Lin28a actúa como un regulador de la pluripotencialidad de la célula madre embrionaria que se encuentra sobre-expresado en neoplasias mieloides, actuando como un oncogén. Sin embargo, los mecanismos de regulación de este gen son completamente desconocidos. Lin28 podría estar reprimido por microRNAs, especialmente la familia hsa-mir-9. Nuestro grupo ha demostrado que hsa-mir-9 se encuentra inactivado por metilación en las leucemias agudas, sugiriendo que los eventos epigenéticos podrían ser determinantes en la expresión de Lin28 en la LAM.

Métodos y resultados: Mediante PCR específica de metilación (MSP) y pirosecuenciación se obtuvo hipermetilación de las islas CpG del promotor de los tres miembros de la familia hsa-miR-9 (miR-9-1, 2 y 3) en líneas de LAM. La metilación se asoció con una disminución en la expresión del hsa-miR-9 maduro. El tratamiento con el agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxycytidine indujo la desmetilación y la reexpresión del hsa-miR-9 indicando que la metilación es responsable de la disminución de la expresión del hsa-miR-9 en la LAM. Para determinar el papel funcional del hsa-miR-9 re-expresamos ectópicamente el miRNA en líneas de LAM mediante nucleofección observando una disminución significativa en la proliferación celular (ensayo MTT) en la línea transfectada con el pre-miR-9, así como un incremento en la apoptosis celular (ensayo Annexina V). Entre las posibles dianas del hsa-miR-9, los análisis bioinformáticos y de renilla-luciferasa mostraron que dicho microRNA controla la expresión de genes supresores tumorales/oncogenes (Foxo1, Sirt1, B-Raf, Cdh1, Pdgfr, Ccne2, Cdk6 y Nfkb) y factores de transcripción implicados en la pluripotencialidad de células embrionarias (Lin28a, Lin28b). Confirmamos a Lin28a como diana de hsa-mir-9 in vitro mediante la expresión ectópica del microRNA en la línea de HL60 que presenta hsa-mir-9 inactivado por metilación, lo que condujo a una represión de Lin28a. Además, se analizaron muestras al diagnóstico de 158 pacientes LAM evidenciando mediante MSP una hipermetilación del hsa-miR-9-1 (8%), hsa-miR-9-2 (30%) y hsa-miR-9-3 (6%), estando al menos uno de ellos metilado en el 35%. La metilación del hsa-miR-9 se asoció con infra-expresión de hsa-mir-9 ($p=0.01$) y sobre-expresión de Lin28a ($p=0.006$). Entre los pacientes con intención de ser tratados, la sobre-expresión de Lin28a se asoció con una menor supervivencia libre de enfermedad (44% vs. 76%, $P=0.01$), supervivencia global (15% vs. 57%, $p=0.001$) y supervivencia libre de eventos (16% vs. 58%, $p=0.001$). En adición, detectamos un polimorfismo A-G en la región 3'UTR de Lin28a donde se une mir9. El análisis bioinformático PICTAR evidenció una mayor cohesión en la unión del mir-9 a lin28a que presenta G frente a A, lo que también se tradujo in vivo en una mayor sobre-expresión de Lin28a en aquellos pacientes AA/AG frente a los GG ($p=0.002$).

Conclusión: La metilación de la familia del hsa-miR-9 en la LAM junto a los polimorfismos genéticos de las regiones 3'UTR dianas, conllevan, una sobre-expresión de Lin28 que afecta desfavorablemente el pronóstico de los pacientes.