

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

SOBREEXPRESIÓN DEL FACTOR YY2 EN CÉLULAS DE CÁNCER.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

PAOLA HILARY ALAMILLA GALICIA.

TUTORA: M. EN C. MAGALI ESPINOSA CASTILLA.

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Cáncer.....	3
Apoptosis.....	3
Proteínas Zinc finger.....	4
Familia Polycomb.....	6
Ying Yang 1.....	6
Ying Yang 2.....	8
Esferoides.....	9
OBJETIVOS	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Especificos.....	12
METODOLOGÍA	13
Líneas celulares.....	13
cDNA de tejidos normales de adulto.....	13
Cultivo celular en monocapa.....	13
Cultivo celular en esferoides.....	13
Viabilidad Celular.....	14
Cristal Violeta.....	14
Extracción de RNA total.....	15
RT-PCR.....	15
Transfección.....	16
Clonación del factor YY2 en el vector pTZ57R/T.....	16
Ligación.....	17
Transformación.....	17
Lisis bacteriana.....	17
Midiprep.....	18
Digestión con enzimas de restricción.....	18
Proliferación celular.....	18
Clonogenicidad celular.....	19
RESULTADOS	21
Expresión del factor YY2 en tejidos normales adultos y en líneas celulares de cáncer.....	21
Clonación en sentido del factor YY2 en el vector de expresión pDsRed-Monomer-N1.....	22
Clonación del factor YY2 en el vector pTZ57/RT.....	22
Ligación del vector pTZ57R/T y el inserto YY2.....	22
Clonación del factor YY2 en el vector pDsRed-Monomer-N1.....	24

Ligación del vector pDsRed y el inserto YY2.....	24
Sobreexpresión del factor YY2.....	26
Viabilidad celular con diferentes estímulos apoptóticos (UVB y Cisplatino), con las líneas celulares HeLa pDsRed-Monomer-N1 y HeLa pDsRed-Monomer-N1/YY2.....	26
Análisis de proliferación celular de las líneas celulares HeLa pDsRed-Monomer-N1 y HeLa pDsRed-monomer-N1/YY2.....	29
Ensayo de Clonogenicidad con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.....	30
Cinética de crecimiento de los esferoides con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.....	32
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXOS.....	43
Cisplatino y UVB.....	43
Abreviaturas.....	44
Abreviaturas de unidades de medición.....	45

SOBREEXPRESIÓN DEL FACTOR YY2 EN CÉLULAS DE CÁNCER.

RESUMEN.

El factor Yin-Yang 2, es una proteína de funcionamiento múltiple implicada en la transcripción, fue originalmente identificada con una inusual similitud del gen YY1 el cual es un factor de transcripción que se expresa en todas las fases del ciclo celular. El YY1 tiene un papel fundamental en procesos biológicos normales tales como embriogénesis, diferenciación, replicación y proliferación celular (Donohoe et al., 1999; Oei et al., 2001). Las funciones que presenta el factor YY2 en la célula son similares a las de YY1, ya que es activador y represor transcripcional, así mismo puede regular algunos promotores que son controlados por YY1 (Nang Nguyen *et al.*, 2004; A. Shrivastava y K. Calame, 1994).

Debido a que la expresión y la función de YY1 está íntimamente relacionada con la progresión de las fases del ciclo celular, el significado fisiológico de la actividad de YY1 se ha aplicado recientemente a modelos de la biología del tumor. La sobreexpresión de YY1 y/o su activación se asocian a la proliferación celular desenfrenada, a la resistencia a los estímulos apoptóticos, a la tumorigénesis y al potencial metastásico. Debido a que el factor YY2 se ha encontrado íntimamente relacionado con el factor YY1 y a que regulan promotores de genes como p53 y c-myc, en este proyecto se decidió sobreexpresar al factor YY2 en una línea celular de cáncer y analizar la sensibilidad a apoptosis, la proliferación, clonogenicidad y el papel que pudiera desempeñar en el crecimiento de esferoides.

Debido a que aún hay pocos reportes sobre la expresión de este factor, se decidió analizar la expresión en un panel de tejidos normales de adulto y en un panel de líneas celulares de cáncer. El Factor YY2 se encontró presente sin mucha variación en su expresión.

Posteriormente, para poder sobreexpresar a este factor, se decidió utilizar al vector pDsRed para clonarlo y se verificó su sobreexpresión por medio de RT-PCR.

Con la línea estable que sobreexpresaba a YY2, se realizaron varios ensayos. Para analizar la sensibilidad a apoptosis, las líneas celulares estables se expusieron a Cisplatino y a UVB. Con los 2 estímulos se observó que las células morían por apoptosis y no hubo diferencia entre los controles y las células que sobreexpresaban a YY2.

En contraste a este resultado, si se encontró diferencia en la proliferación. Las células que sobreexpresaban a YY2 proliferaron más que las células control. Aunado a esto, también se observó que además de aumentar la capacidad de proliferación, el factor YY2 aumentaba la capacidad de clonogenicidad de las células.

Finalmente, se analizó de qué manera influía la sobreexpresión de YY2 en el cultivo tridimensional y se pudo observar que los esferoides obtenidos eran mucho más grandes y más compactos.

Finalmente, se puede concluir que se determinó la expresión del factor YY2 en tejidos normales adultos, así como en las líneas celulares de cáncer; se logró satisfactoriamente la clonación y sobreexpresión del factor YY2.

A partir de los datos que se obtuvieron de los ensayos, se puede inferir que el factor YY2, se encuentra relacionado con los procesos de proliferación celular y clonogenicidad celular, aunque hacen falta estudios para determinar de que manera está participando.

INTRODUCCIÓN.

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales en las cuales las células transformadas son el resultado de los procesos micro-evolutivos de reparación local del DNA dañado. Las células acumulan mutaciones puntuales y cambios localizados de secuencias en el DNA, se juntan múltiples alteraciones genéticas que las hacen más eficientes y las células somáticas mutantes individuales empiezan a prosperar a expensas de sus vecinas. Una célula anormal aislada que no prolifere más que sus vecinas normales, no produce ningún daño significativo, pero si su proliferación está fuera de control producirá un tumor (Alberts *et al.*, 2002).

Las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias: (1) se reproducen a pesar de las restricciones normales e (2) invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células (Alberts *et al.*, 2002). Se incluye, la evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis, la habilidad para metastatizar e invadir tejido sano (Hornberg *et al.*, 2006).

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular. Es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo, por lo que su estudio es primordial. Es un mecanismo desarrollado por los organismos pluricelulares, muy conservado evolutivamente y que se presenta, prácticamente en todos los modelos animales estudiados (Comella *et al.*, 1999).

La apoptosis es considerada como una muerte natural fisiológica de autodestrucción. Es un mecanismo de eliminación de células no deseadas,

dañadas o desconocidas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003).

Este tipo de muerte, se acompaña de un redondeamiento de la célula, con retracción de los pseudópodos, reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo (cariorexis), con escasa o nula modificación ultraestructural de los organelos citoplasmáticos incluidos en convoluciones de la membrana, las cuales son llamadas cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos son fagocitados, por lo que no existe una reacción inflamatoria. Frecuentemente la fragmentación del ADN es utilizada como sello para definir apoptosis. (Jordán, 2003; De Toro, 2006).

Proteínas de dedos de Zinc.

Las proteínas que contienen dominios del tipo «dedo de zinc» son capaces de unirse a secuencias definidas del ADN, actuando como Factores de Transcripción (FT) (Fig.1). La secuencia de un dedo de zinc es: Cys-X₂-4-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃-His (V. Janssens *et al.*, 1999).

El número de dedos de zinc oscila alrededor de 9 repeticiones, que ocupan casi toda la proteína, o sólo un pequeño dominio con dos dedos (Fig.2) (Gómez F, 2003).

La porción C-terminal de cada dedo forma alfa-hélices que se unen al ADN y la porción N-terminal forma una estructura laminar-beta. Las secuencias alfa-hélices se colocan sobre una vuelta del surco mayor. Se cree que los aminoácidos no conservados en la porción C-terminal de cada dedo son responsables del reconocimiento de los puntos diana específicos (Gómez F, 2003).

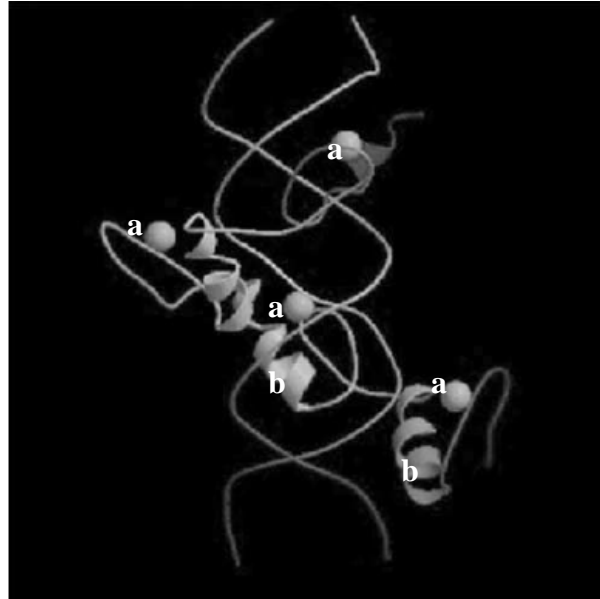


Figura 1. Estructura co-cristalina de YY1. La proteína contiene 4 tipos de C2H2 motivos de dedos de zinc (a) y dos dominios específicos que caracterizan su función como activador y represor (b) (Houbaviy *et al.*, 1996).

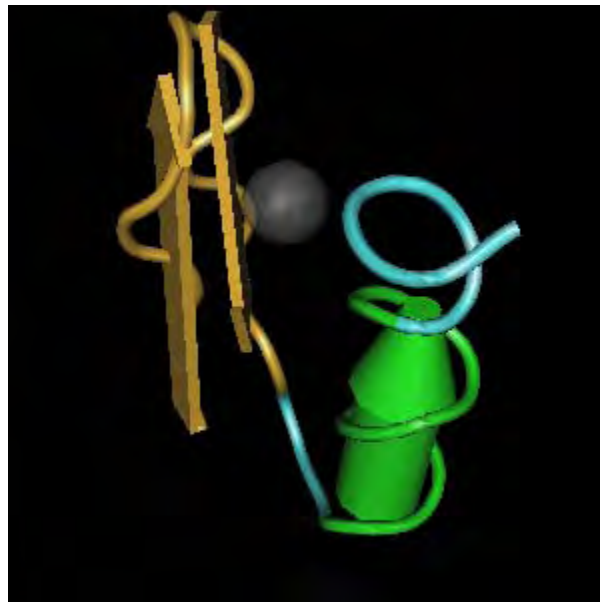


Figura 2. Secuencia del tercer dominio del dedo del zinc de la proteína transcritiva humana YY1 (Viles JH., *et al.* 1998)

Familia Polycomb.

Las proteínas del grupo Polycomb (PcG) regulan la memoria celular epigenética de la expresión de genes cruciales para el desarrollo de los organismos multicelulares.

Las PcG fueron identificadas originalmente en *Drosophila melanogaster*, como factores necesarios para la embriogénesis reprimiendo los genes de Hox de una manera cuerpo-segmento-específica (Jurgens, G. 1985).

Hoy en día es reconocida como una familia grande de proteínas asociadas a la cromatina (conservada desde las plantas hasta los seres humanos).

Las PcG están implicadas en muchos procesos celulares, incluyendo el modelaje del cuerpo, la inactivación del cromosoma X en los mamíferos femeninos y la venación en las plantas (Sarah J. *et al.*, 2007).

Algunas proteínas que pertenecen a la familia Polycomb son: Pc, Psc, dRing, en *Drosophila*, HP1, Cbx, YY1, entre otras (Sarah J. *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 1991); remodelan factores o la maquinaria de la transcripción y facilitan la compactación de la cromatina ([Sauvageau M.](#) *et al.*, 2008).

Yin Yang 1.

El Ying Yang 1 (YY1), es un factor transcripcional multifuncional de dedos de Zinc y es un miembro de la familia del grupo de proteínas Polycomb. El YY1 fue descrito por Shi (Shi *et al.*, 1991). También es conocido como δ (delta) (Hariharan *et al.*, 1991), NF-E1 (Park y Atchison, 1991), UCRBP (Franagan *et al.*, 1992) y CF1 (Thomas y Seto, 1999).

El YY1 fue clonado y caracterizado simultáneamente por dos grupos de trabajo independientes en el año de 1991; el grupo de Shi y colaboradores, y el de Park y Atchison (Shi *et al.*, 1991; Park y Atchison, 1991).

El YY1 se encuentra en la región del telómero 14 en el segmento q32.2 (Yao *et al.*, 1998) (Fig. 3). El gen de YY1 consiste en cinco exones altamente conservados que codifican una proteína de 414 aminoácidos con un peso molecular de 44 KDa (Shi *et al.*, 1997). YY1 se localiza subcelularmente en el núcleo y matriz nuclear (McNeil *et al.*, 1998).

El gen de YY1 en humanos produce ocho diferentes transcritos (a, b, c, d, e, f, g, y h), generados por splicing alternativo. Se codifican ocho diferentes isoformas de proteínas, de las cuales tres de ellas están completas, tres presentan el sitio carboxilo completo y dos son parciales. La funcionalidad de estas isoformas aún no ha sido determinada (S. Gordon *et al.*, 2006).

El YY1 es una proteína de funcionamientos múltiples que se expresa en todas las fases del ciclo celular, está implicada en la regulación, activación y represión trascricional y ha sido progresivamente caracterizada desde 1996. YY1 es un factor de transcripción que tiene un papel fundamental en procesos biológicos normales tales como embriogénesis, diferenciación, replicación y proliferación celular. (Shi *et al.*, 1997; Nang N. *et al.*, 2004).

El YY1 tiene un papel en la activación y represión de algunos genes. Los mecanismos de acción incluyen la activación directa o represión, la activación indirecta o represión vía reclutamiento del cofactor y activación o represión por ruptura de sitios conformacionales de cambios de DNA (S. Gordon *et al.*, 2006). Como factor de la transcripción YY1 regula la expresión de diversos genes, tales como *C-Myc*, *p53* y *cdc6* (Shi *et al.*, 199; Thomas M. *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2004).

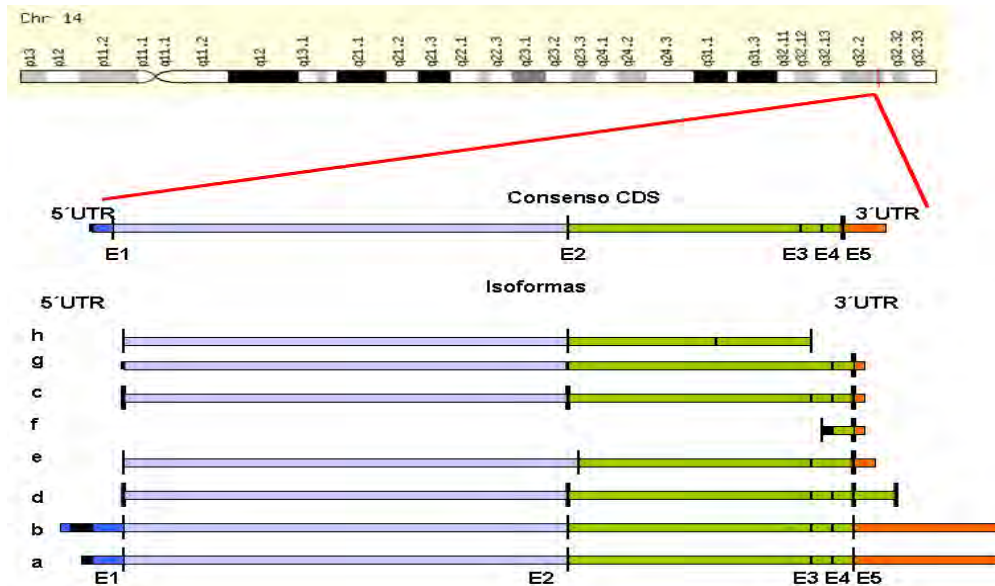


Figura 3. Localización de YY1 en el cromosoma 14q32.2 y sus ocho diferentes transcritos (a-h). (PubMed) (S. Gordon *et al.*, 2006).

Yin Yang 2

El Yin Yang 2 (YY2), fue originalmente identificado con una inusual similitud con los dedos de zinc característicos de la proteína YY1. El YY2 es una copia de la retroposición de YY1, la cual fue insertada en otro locus de un gen llamado Mbtps2. Estudios basados en la detección de YY2 en mamíferos placentados, estiman que la retroposición de YY2 ocurrió después de la divergencia de éstos a partir de otros vertebrados (Chunqing Luo *et al.*, 2005).

Utilizando el análisis de datos de DNA y secuencias de aminoácidos, el grupo de Nang, descubrió que al menos existía una proteína con estructura y funciones similares a las de YY1, la cual fue designada como YY2 en humanos (Nang N *et al.*, 2004).

Un análisis de la secuencia del factor YY2, reveló una identidad total del 65% en la secuencia del DNA y del 56% en la secuencia de la proteína comparada con YY1

en humanos (Nang N. *et al.*, 2004). La semejanza más pronunciada entre YY1 y YY2 existe dentro de las regiones de dedos del zinc de las dos proteínas.

El YY2 puede regular algunos promotores conocidos que son controlados por YY1, Nang N. *et al.*, demostraron que YY2 interactúa con oligonucleótidos que contienen sitios de unión del YY1 de promotores de colonias de macrófagos granulocíticos estimulado por factores como; p53, cMyc, c-fos y CXR4. De forma similar a YY1, YY2 contiene funciones de activación y represión transcripcional (Nang N. *et al.*, 2004). YY2 contiene una potente activación en su dominio N-Terminal, específicamente en los residuos 3-102 y su dominio C-terminal represor, en los residuos 237-372 (Nang N. *et al.*, 2004).

El gen de YY2 se encuentra en el cromosoma X en el segmento [Xp22.11](#) (Fig. 4) (Chunqing Luo *et al.*, 2005).

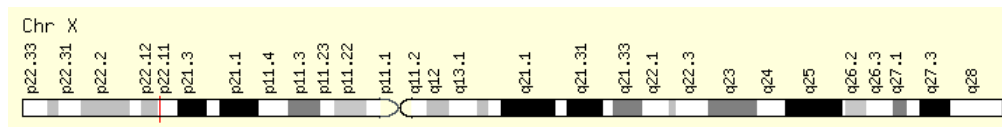


Fig. 4 Localización del YY2 en el cromosoma [Xp22.2-p22.1](#).

Esferoides.

Los esferoides tumorales multicelulares son sistemas de cultivos celulares tridimensionales inducidos por cultivo en suspensión (Haga T. *et al.*, 2008).

Los esferoides presentan una compleja red organizada con interacciones y contactos tridimensionales célula-célula y célula-matriz extracelular, por lo tanto cada célula está expuesta a diferentes condiciones de espacio y de disponibilidad de nutrientes (Mueller-Klieser, 1997; Santini MT *et al.*, 1999).

Morfológicamente se pueden observar tres capas celulares en los esferoides: un centro apoptótico/necrótico, una capa intermedia de células quiescentes y una capa externa de células en proliferación (Fig. 5) (Kunz-Shughart *et al.*, 1998). Estas capas favorecen la formación de microambientes y la distribución diferencial de nutrimentos, oxígeno, glucosa, lactato, factores de crecimiento y pH. La capa necrótica/apoptótica es la más escasa de nutrientes y principalmente de oxígeno (hipoxia) (Walenta *et al.*, 2002). Otro aspecto importante de la morfología celular de los esferoides multicelulares tumorales, es que se asemejan a tumores primarios *in vivo*, por su capacidad de desarrollar células necróticas en áreas lejanas a las fuentes de oxígeno y nutrimentos (Franko AJ, 1979).

Los cultivos en monocapa crecen exponencialmente mientras que los esferoides al igual que los tumores sólidos están caracterizados por una fase exponencial temprana seguida por un periodo de crecimiento lento. La primera fase no depende de los factores externos mientras que la segunda depende del tamaño, así como las restricciones nutricionales impuestas a las células localizadas en el interior (Santini MT *et al.*, 1999).

Una de las mayores razones por las que los agentes antineoplásicos pueden ser inefectivos en la destrucción de tumores es que las células tumorales se vuelven resistentes a los fármacos utilizados. En algunos casos, ésta resistencia también abarca otros agentes antineoplásicos que no han sido utilizados con anterioridad (resistencia a multifármacos). La resistencia a multifármacos ha sido estudiada ampliamente en cultivos de monocapa de células tumorales y se ha obtenido información muy valiosa. Sin embargo, la información obtenida con los cultivos en monocapa se presenta en constante contradicción con las observaciones hechas a nivel clínico (Santini MT *et al.*, 1999).

Se ha postulado que los mecanismos que son responsables de la resistencia a la radiación y la adquisición de resistencia a fármacos en tumores sólidos tridimensionales pueden involucrar diversos tipos de interacciones intercelulares las cuales no están necesariamente presentes en los cultivo monocapa

bidimensionales (Wartenberg *et al.*, 2003; Santini MT *et al.*, 1999). De hecho el “efecto de contacto”, aunado a la hipoxia, han sido hipotetizados como una de las principales causas para la gran resistencia a la radiación ionizante que tienen los esferoides con respecto a las células monocapa. Este efecto fue descrito por primera vez por Durand y Sutherland y se ha visto implicado en la resistencia a fármacos (Desoize BV *et al.*, 2000). Es evidente que la forma tridimensional de los esferoides tumorales multicelulares pueden ser un modelo de mucha ayuda en la simulación de las primeras etapas de un tumor *in vivo*. Este modelo puede ser usado para estudiar los efectos de la radiación, fármacos, etc., de una forma más real que en los cultivos monocapa (Santini MT *et al.*, 1999).

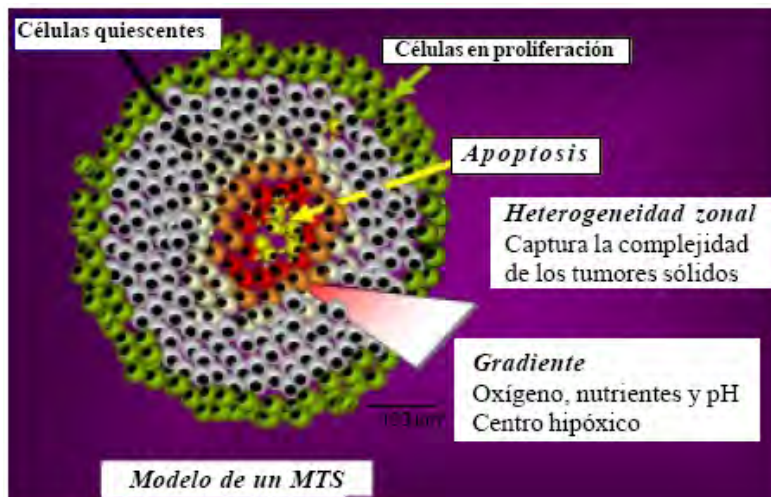


Fig 5. Estructura de un esferoide. Se muestran las tres principales capas: células proliferativas, quiescentes y necróticas (Gallardo JC *et al.*, 2006).

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Sobreexpresar el factor YY2 en células de cáncer y analizar su efecto en la sensibilidad a apoptosis, proliferación, clonogenicidad y en el crecimiento de esferoides.

Objetivos Específicos.

1. Analizar la expresión del factor YY2 en tejidos normales adultos y en líneas celulares de cáncer.
2. Clonar en sentido al factor YY2 en el vector pDsRed-Monomer-N1.
 - a. Amplificar el RNA mensajero de YY2.
 - b. Clonar al factor YY2 en el vector pDsRed.
 - c. Comprobar que la secuencia del factor YY2 se encuentre en sentido.
 - d. Transfectar la línea celular Hela con el vector pDsRed y con el vector pDsRed/YY2sense
 - e. Analizar la sobreexpresión del YY2 mediante la técnica de RT-PCR.
3. Realizar Viabilidad celular con diferentes estímulos apoptóticos (Cisplatino y UVB), con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.
 1. Analizar la proliferación celular de las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.
 2. Realizar ensayo de Clonogenicidad con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.
 3. Analizar la cinética de crecimiento de los esferoides con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.

METODOLOGÍA

Líneas celulares.

HeLa. Línea celular derivada de adenocarcinoma de cérvix (Número de la ATCC: CCL-2). Esta línea celular contiene el virus de papiloma humano tipo 18.

MG63. Línea celular de osteosarcoma de hueso (número de la ATCC: CRL-1427).

U2OS. Línea celular de osteosarcoma de hueso (número de la ATCC: HTB-96).

HEK293. Línea celular derivada de riñón embrionario de humano. Esta línea celular contiene adenovirus tipo 5.

Sw48. Línea celular derivada de adenocarcinoma colorectal. (Número de la ATCC: CCL-231).

cDNA de tejidos normales adultos.

Tejido de pulmón humano adulto.

Tejido de colon descendente humano adulto.

Tejido de hígado humano adulto.

Tejido de colon humano adulto.

Tejido de riñón humano adulto.

Cultivo celular en monocapa.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (medio modificado por Dulbecco el cual contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el B.M.E).suplementado con 5% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v).

Cultivo celular en esferoides.

El cultivo en esferoides multicelulares se preparó utilizando la tecnología de recubrimiento líquido (Liquid Overlay), modificado de Yuhas *et al.*, 1977. Las cajas de cultivo de 25 cm², fueron cubiertas con agarosa al 1%. Después de que la agarosa gelificó, se sembraron 1x10⁶ células con medio DMEM suplementado con el 5% de suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ (v/v), durante dos días. Posteriormente los agregados celulares se cambiaron a pHEMA-plates de 25 cm (no adheribles) con medio Leibovitz L-15 suplementado con suero fetal bovino al 5%. Las cajas se colocaron en un agitador orbital, a una velocidad de 100 rpm, a 37°C, durante 8 días, cambiándoles diariamente el medio. Los esferoides se midieron con una reglilla (micrómetro) a los días 2, 4, 6 y 8.

Viabilidad Celular.

Las células HeLa se sembraron en placas de 96 pozos, al 80% de su confluencia. Se expusieron a diferentes concentraciones de cisplatino (20µM, 40µM, 50µM y 60µM), y se incubaron durante 24 h. Pasado este tiempo, las células se observaron al microscopio y se procedió con la técnica de cristal violeta. El experimento se realizó por triplicado.

Para determinar la viabilidad celular con UVB, las células HeLa se sembraron de la misma manera y se irradiaron a diferentes tiempos (5", 10", 25" y 35"). Posteriormente, las células se incubaron durante 24 y 48 h. Las células se observaron al microscopio y se procedió con la técnica de cristal violeta. El experimento se realizó por triplicado.

Cristal Violeta.

Las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con etanol al 70% frío y se incubaron a -20°C durante 10 min. La placa se dejó secar y las células se tiñeron

con Cristal violeta (0.1% en agua). Las células teñidas se solubilizaron en ácido acético al 33%. La absorbancia se determinó en el lector de ELISA a 570nm.

Extracción de RNA total.

La extracción de RNA total se realizó con 1 millón de células.

El RNA total se extrajo con trizol (Invitrogen). Brevemente, las células se homogenizaron con trizol, se les agregó cloroformo, se centrifugaron y la fase acuosa se precipitó con isopropanol. La pureza se comprobó con la relación 260/280 D.O. y la integridad con geles de agarosa.

RT-PCR.

La síntesis se hizo a partir de 1 µg de RNA total usando hexámeros al azar y a la enzima transcriptasa reversa termoestable de la siguiente manera: 1 µg de RNA total se desnaturalizó a 65°C durante 5 minutos, se agregaron hexámeros sintetizados al azar, desoxinucleótidos y enzima transcriptasa reversa en el buffer adecuado. Se incubó por 50 minutos a 50°C, la reacción se paró a 85°C y se incubó durante 20 minutos a 37°C con RNAsa H.

El ADN complementario se amplificó con desoxinucleótidos (dNTPs), buffer, enzima polimerasa ADN termoestable y oligos específicos para el gen de interés.

Las condiciones para este ensayo fueron: 2.5 unidades de polimerasa Amplitaq, 2 mM de desoxinucleótidos, 10 picomolar de primers y 1.5 mM de MgCl₂.

La expresión del ARN mensajero se normalizó con la expresión de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Oligos.

YY2

sentido: 5' AACTAGAATTCAGCCATGGCCTCCAACG 3'

antisentido: 5' GAGGGGGATCCTCCTTTCACGGGTTGTTT 3'

Condiciones.

94°C 30", 68°C 2', 3 ciclos (3x)

94°C 30", 60°C 2', 40 ciclos (40x).

72°C 5'.

GAPDH.

sentido: 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3'

antisentido: 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC3'

Condiciones.

95° C 10'

95° C 30", 60° C 30", 72° C 30", 2 x 28

72° C x 5`

4° C

Transfección.

Se sembraron 250,000 células HeLa en cajas de 25mm. Se transfectaron con el vector vacío pDsRed y con el vector pDsRed/YY2 sense, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El DNA se mezcló con la Lipofectamine 2000 en medio sin suero y se incubó durante 5 minutos. La mezcla se agregó a las células por 15 minutos y se incubaron a 37°C. El medio se cambió después de 6h.

Las células se seleccionaron por cuatro semanas con Geneticina.

Clonación del factor YY2 en el vector.

Se diseñaron oligos específicos para amplificar el marco completo de lectura del RNAm del YY2. Se realizó PCR y el producto amplificado, se purificó del gel de agarosa con el Kit QIAEX II de Qiagen y se clonó en el vector.

Ligación.

La ligación se realizó con la enzima T4DNA (Kit Rapid DNA Ligation and Transformation) y se utilizaron las relaciones 1:3 y 1:1 vector y el inserto (YY2), tomando como referencia 100ng del vector.

La reacción se incubó a 16°C, durante 24 horas.

Transformación.

En una caja petri con medio LB, se sembraron bacterias DH5alfa a 37°C durante 24 h. Al siguiente día, las bacterias se incubaron en medio C, durante 4 h a 37°C en movimiento. Posteriormente se preparó la solución de transformación, utilizando el Kit TransformAid™ Bacterial Transformation Kit #K2711 de fermentas. Las bacterias se transformaron, con las ligaciones y se plaquearon en placas de agar LB/ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Lisis bacteriana.

Se seleccionaron algunas colonias de las bacterias transformadas para observar cual de las colonias tenía el inserto.

Las colonias seleccionadas se cultivaron en medio LB/ampicilina. Se incubaron en movimiento a 37°C durante 24 h.

Para realizar la lisis bacteriana se prepararon 500 μ l de Buffer de lisis con las siguientes cantidades .05 g de agarosa, 120 μ l de KCl 250mM, 5 μ l de NaOH 10N, 5 μ l de EDTA .5M, 5 μ l de SDS al 25% y 20 μ l de bromofenol al 1%.

De las colonias que se crecieron, se tomaron 200 μ l y se centrifugaron a 9000rpm, el botón se resuspendió en 100 μ l de Buffer previamente colocado a 37°C durante 5 min, posteriormente se centrifugaron a 9500 rpm durante 10 min y se corrieron en un gel de agarosa al 2x.

Midiprep.

Se realizó midiprep de la colonia seleccionada. El plásmido se extrajo utilizando el método de lisis, desnaturalización y neutralización; y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. El tamaño del plásmido se verificó digiriéndolo con una enzima que lo linearizara y utilizando como referencia el marcador de peso molecular de 1Kb.

Digestión con enzimas de restricción.

Una vez que se extrajo el plásmido con el YY2, se realizó la digestión del vector (pDsRed) y el inserto (YY2) con las endonucleasas y en el Buffer adecuado, posteriormente se incubó durante 3H a 37 °C.

Las enzimas empleadas se enlistan a continuación:

- EcoRI
- BamHI

Proliferación celular.

Las células HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2, se sembraron en placas de 96 pozos, 3000 células por pozo (Fig. 7), con las condiciones antes descritas, en cultivo celular, durante 8 días.

A partir del segundo día, se comenzaron a fijar las células diariamente por carril con etanol al 70 % frío. A concluir el octavo día, se procedió a realizar la técnica de cristal violeta.

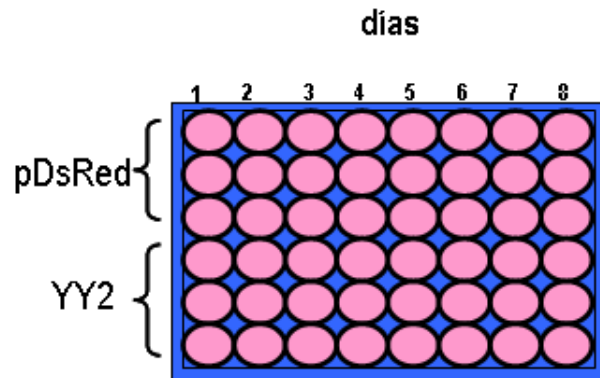


Fig. 7 Esquema del sembrado en las placas de 96 pozos para la proliferación celular.

Clonogenicidad celular.

En una placa de 96 pozos se sembraron células HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2, en el primer pozo se sembraron 4000 células y de ahí se realizaron diluciones (Fig. 8).

Las células se cultivaron en condiciones de cultivo de monocapa, en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v), durante 20 días. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con PBS al 1x y se fijaron con etanol al 70% frío y se realizó la técnica de cristal violeta. Las células se contaron y posteriormente se disolvieron

con ácido acético al 33%. La absorbancia se determinó en el lector de Elisa a 570nm.

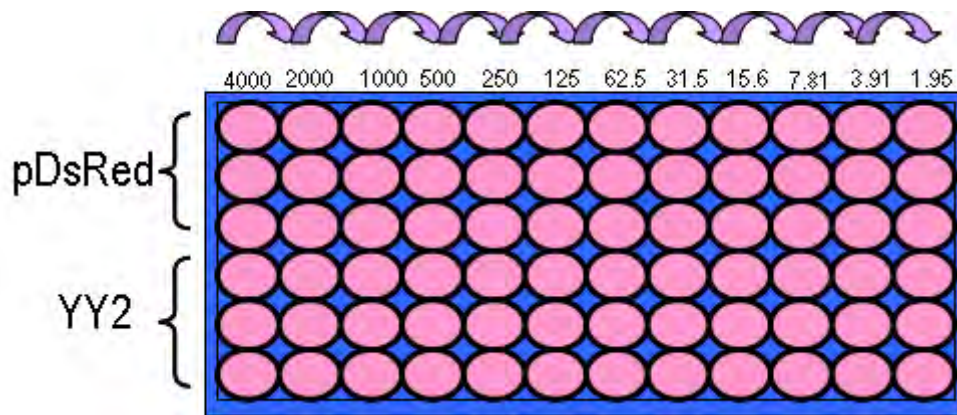


Fig 8. Esquema representativo de las diluciones empleadas para el ensayo de clonogenicidad. Los números indican el N° de células por pozo, dependiendo del carril.

RESULTADOS.

Expresión del factor YY2 en tejidos normales adultos y en líneas celulares de cáncer.

El factor YY2 se encuentra relacionado con la activación y represión de diversos genes, se le ha relacionado con la proliferación celular, la apoptosis, la tumorigenesis y la metastasis celular, sin embargo se conoce poco sobre los mecanismos en los que esta implicado, así como también no se sabe, en cuales tejidos y en que líneas y celulares se expresa.

Se diseñaron oligos específicos que amplifican el marco completo de lectura del factor YY2.

Se realizó una curva de saturación para estandarizar las condiciones de amplificación. En la Fig. 9, se muestra el producto amplificado de 1081pb.

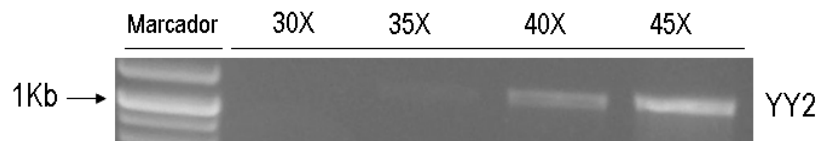


Fig. 9 Curva de saturación del Factor YY2 en la línea celular HeLa.

Se analizó la expresión del factor YY2 en un panel de tejidos adultos normales. El factor YY2 se expresó en todo el panel de tejidos con una expresión similar (Fig. 10).

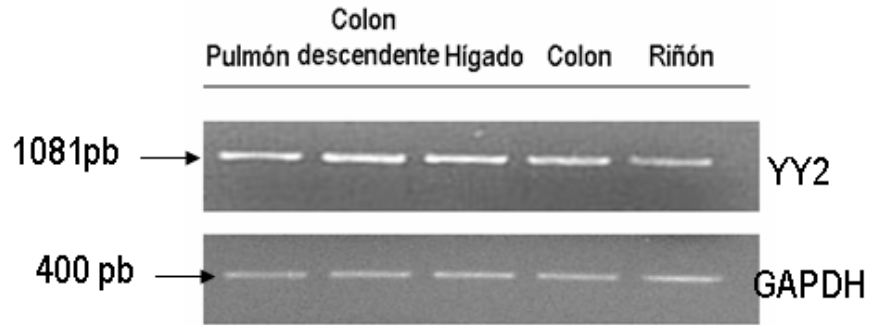


Fig. 10 Expresión del factor YY2 en tejidos normales adultos.

De igual manera, para determinar en que líneas celulares de cáncer se expresa el factor YY2, se realizó un panel con distintas líneas celulares de cáncer (Fig. 11), observándose que en todas las líneas tiene una expresión similar, con excepción de U2OS, en donde tiene menor expresión.

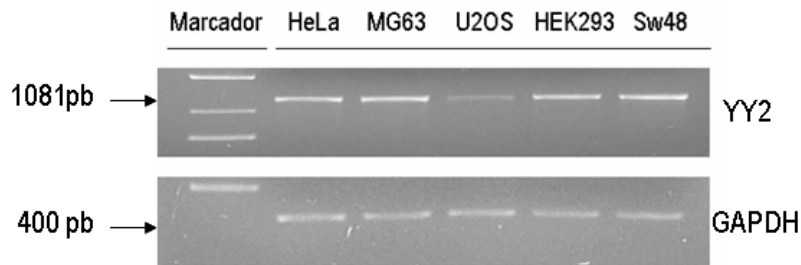


Fig. 11 Panel de líneas celulares de cáncer que expresan el factor YY2.

Clonación en sentido del factor YY2 en el vector pDsRed.

Debido a los pocos estudios que se han realizado en YY2 y a sus implicaciones en la proliferación y el cáncer, se decidió realizar el diseño del plásmido pDsRed/YY2, para poder sobreexpresarlo en la línea celular HeLa y determinar su relación en algunos ensayos de proliferación y apoptosis celular. El diseño de este plásmido en estudios posteriores nos permitirá determinar algunas de sus implicaciones a nivel celular.

Clonación del factor YY2 en el vector pTZ57/RT.

El producto amplificado de YY2 se corrió un gel de agarosa al 2%, se purificó y se cuantificó.

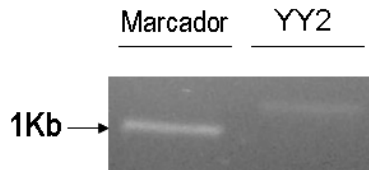


Fig. 12 Purificación del YY2.

El inserto se ligó al plásmido abierto pTZ57R/T con las siguientes relaciones.

Ligaciones 1:1 y 1:3 del vector pTZ57R/T con el YY2.

Una vez que se obtuvo el plásmido pTZ57R/T/YY2, se procedió a digerir con las enzimas de restricción.

Para comprobar los pesos moleculares de las digestiones se corrió un gel de agarosa al 2%. La digestión con EcoRI, para obtener el plásmido linealizado (Fig. 13) y con las enzimas EcoRI y BamHI, para extraer el fragmento completo de YY2. Se obtuvo un fragmento de 1120 pb (Fig.12).

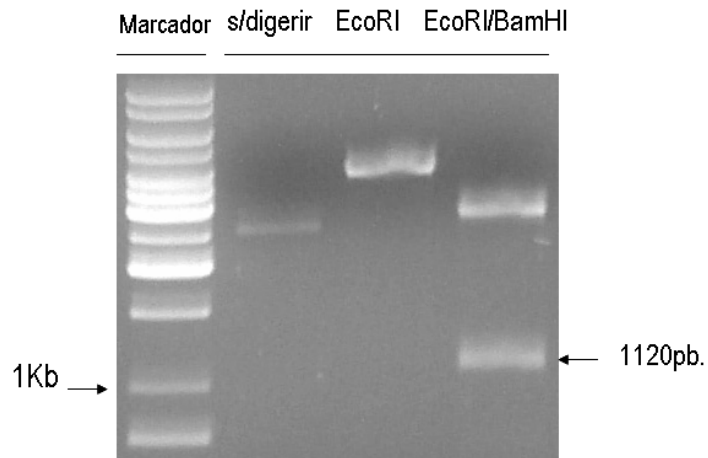


Fig. 13 Digestión del vector pTZ57R/T/YY2, con las enzimas de restricción EcoRI, para linealizar el plasmido. EcoRI y BamHI para obtener el inserto de YY2.

Clonación del factor YY2 en el vector pDsRed.

Ligación del vector pDsRed y el inserto YY2.

El vector pDsRed al igual que el factor YY2, se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI (Fig. 14) y se purificó del gel de agarosa al 2%.

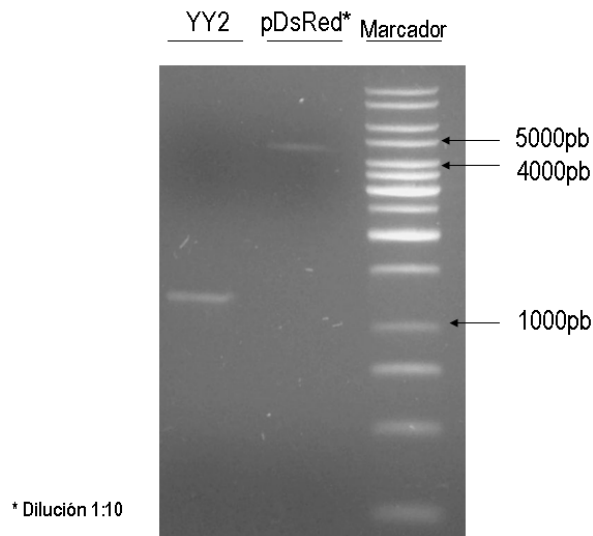


Fig. 14 Digestión con EcoRI/BamHI y purificación del vector pDsRed (4670pb) y el inserto YY2 (1120pb).

Una vez digeridos tanto el vector como el inserto se realizaron las ligaciones del pDsRed y del factor YY2.

Para poder realizar la ligación se cuantificaron el vector (pDsRed) y el inserto (YY2). Posteriormente se realizaron las ligaciones 1:1 y 1:3 del vector pDsRed con el factor YY2.

Se transformaron bacterias con las ligaciones y las colonias obtenidas se analizaron con enzimas de restricción para verificar que el inserto estuviera bien clonado.

Una vez que se probó y se determinó que la construcción del plásmido pDsRed/YY2, se realizó correctamente, con la ayuda del programa PlasMapper (Clontech) se hizo el esquema representativo del mapa genómico del plásmido diseñado (Fig. 15).

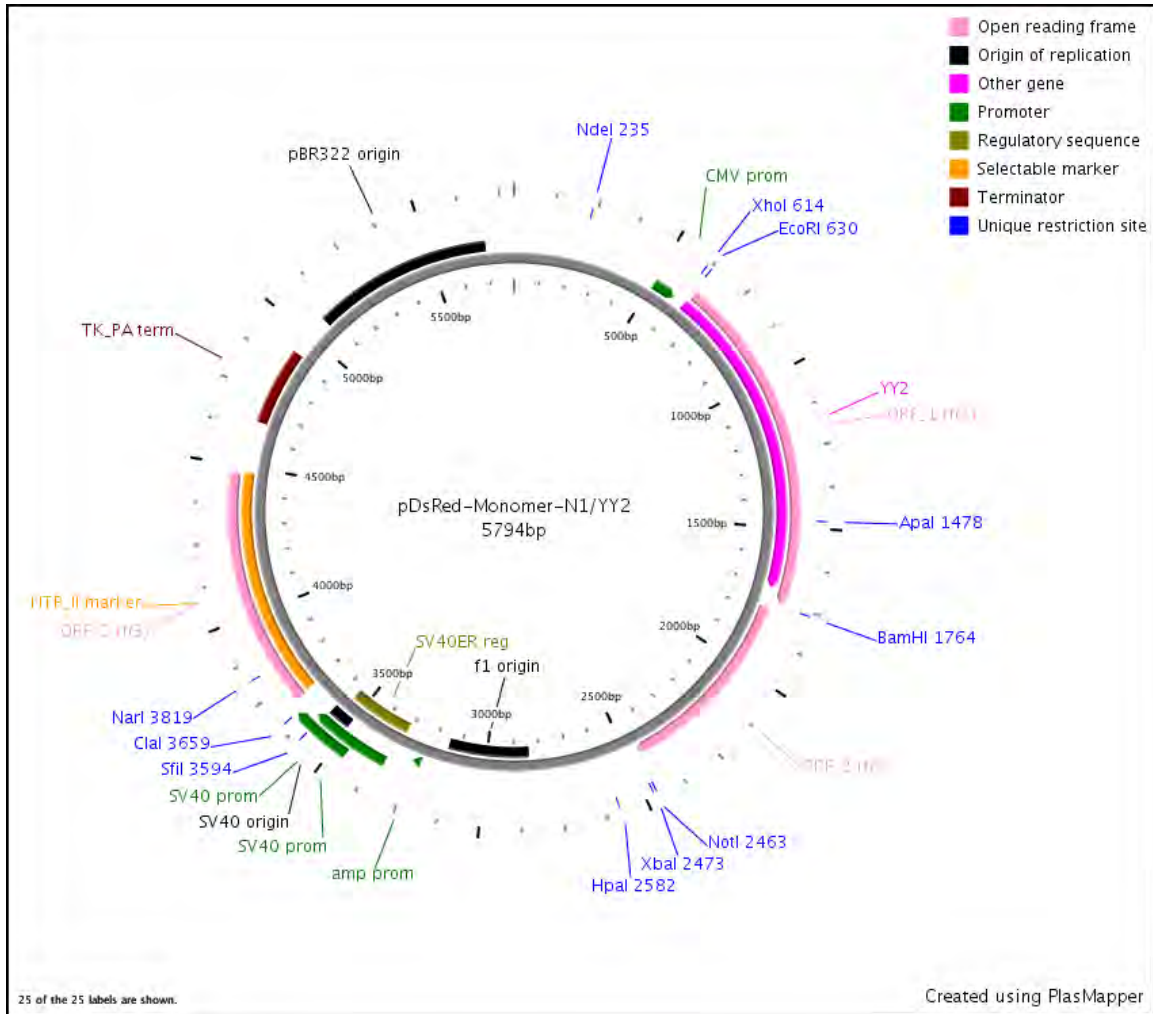


Fig.15 Estructura del plásmido pDsRed/YY2.

Sobreexpresión del factor YY2.

La línea celular HeLa se transfectó con los vectores pDsRed y pDsRed/YY2. Las células se seleccionaron por dos semanas y posteriormente se extrajo RNA total para analizar la expresión del Factor YY2.

En la Fig. 16 se puede observar la sobreexpresión de YY2 en la línea celular HeLa.

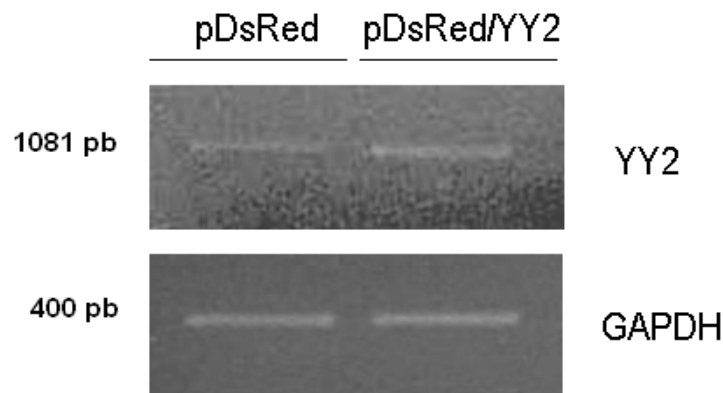


Fig. 16 Sobreexpresión del factor YY2. Las células trasfectadas con el vector pDsRed y con el inserto pDsRed/YY2 se analizaron por RT-PCR.

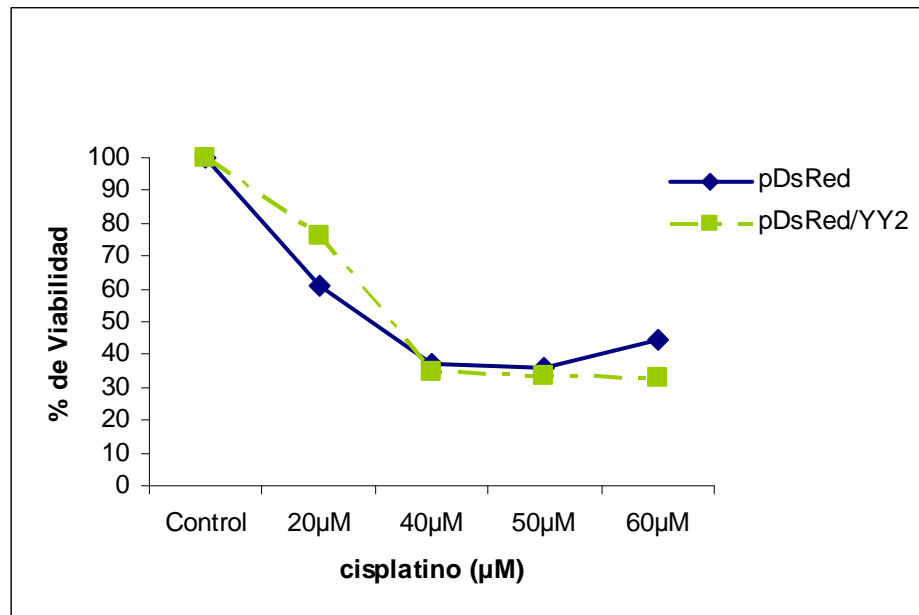
Viabilidad celular con diferentes estímulos apoptóticos (UVB y Cisplatino), con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.

Para determinar si la sobreexpresión del factor YY2, modificaba la sensibilidad a la apoptosis, las células con los vectores HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2 se expusieron a Cisplatino y a la luz UVB (ver anexos), para determinar su viabilidad celular.

El cisplatino es un fármaco antineoplásico que induce la muerte celular programada (apoptosis). De la misma manera la luz UVB induce apoptosis en aquellas células que presentan excesivo daño en el DNA.

Las células se expusieron a diferentes concentraciones de cisplatino (20 μ M, 40 μ M, 50 μ M y 60 μ M, durante 24 h.

En la gráfica 1 podemos observar que las células murieron por apoptosis y no hubo diferencia en la viabilidad celular entre las células control y las células que sobreexpresan al factor YY2.

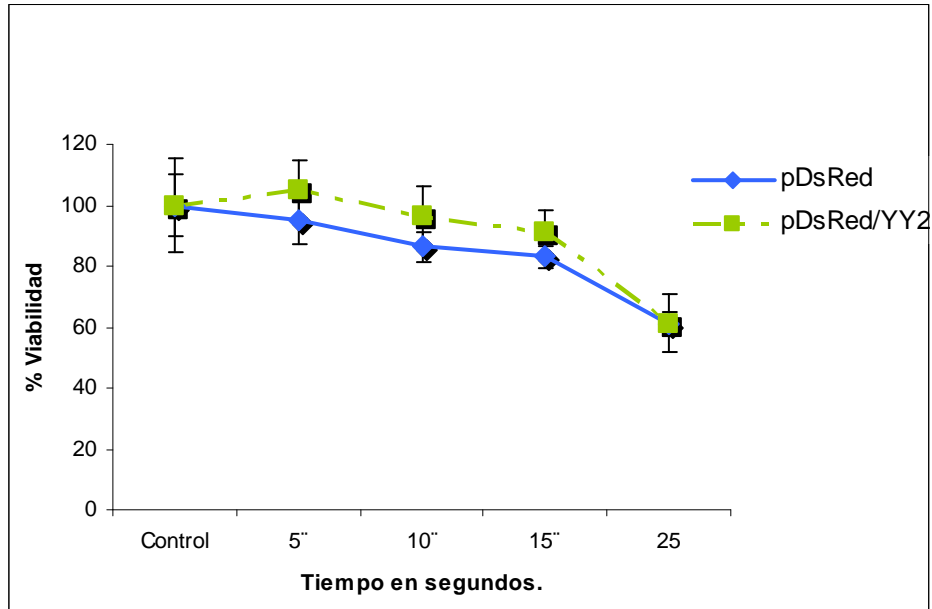


Gráfica 1. Viabilidad de las células HeLa pDsRed y pDsRed-Monomen-N1/YY2 expuestas a cisplatino.

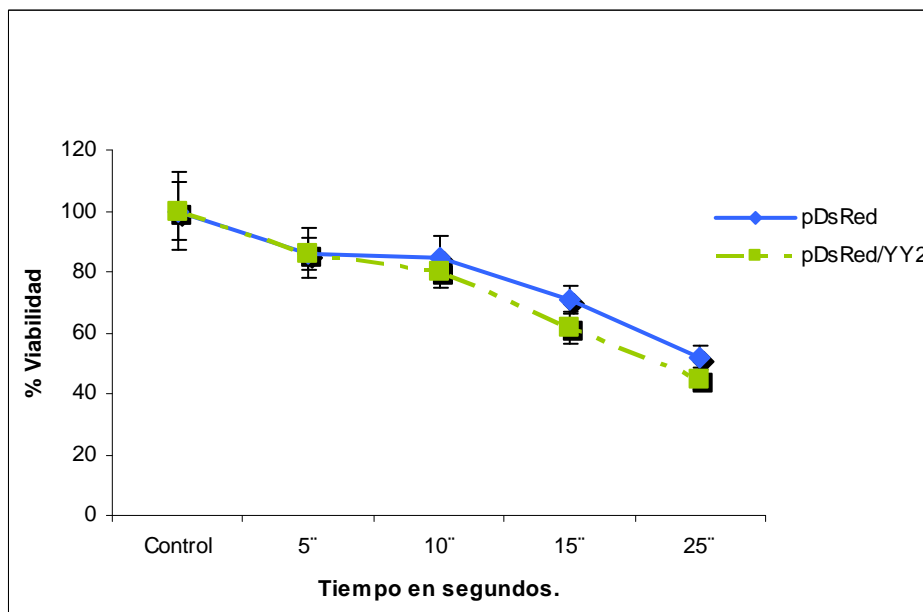
Las células se expusieron a UVB a diferentes tiempos (5", 10", 15" y 25") y se incubaron por 24h y por 48h.

Pasado este tiempo, se pudo observar en el microscopio que se formaron los cuerpos apoptóticos debido a la muerte celular.

En las gráficas 2 y 3, se puede apreciar que no existe diferencia en la viabilidad celular entre las células control y las células que sobreexpresan al factor YY2.



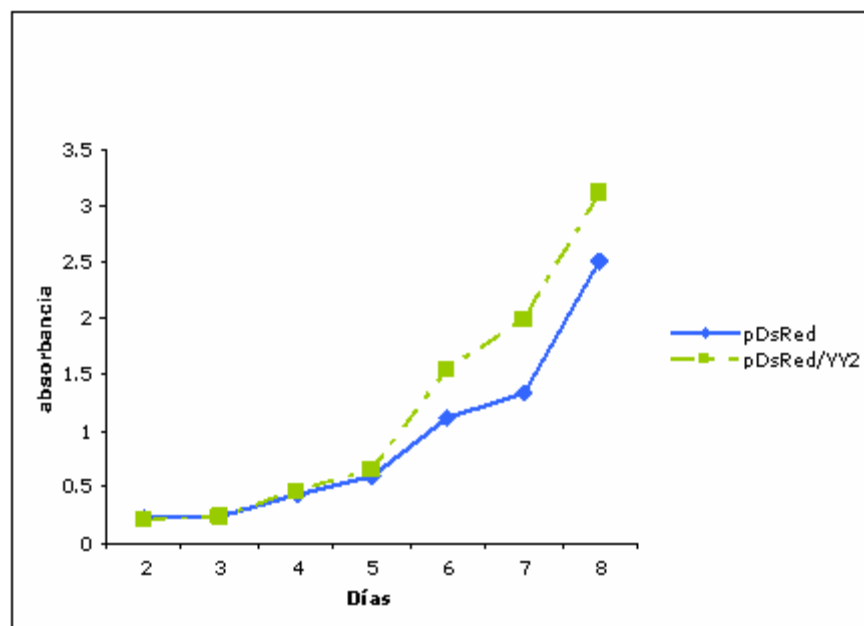
Gráfica 2. Viabilidad de células HeLa pDsRed y pDsRed/YY2, expuestas a UV (5'', 10'', 15'' y 25''), 24 h.



Gráfica 3. Viabilidad de células HeLa pDsRed y pDsRed /YY2, expuestas a UV (5'', 10'', 15'' y 25''), 48 h.

Análisis de proliferación celular de las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.

El ensayo de Proliferación nos permite observar la capacidad que presentan las células para dividirse, en nuestro caso para determinar esta proliferación en las células, se realizó una curva de proliferación. En la gráfica 4, se puede apreciar que las células que sobreexpresan al factor YY2 tienen una mayor proliferación a partir de quinto día.



Gráfica 4. Curva de proliferación celular en HeLa pDsRed y pDsRed/YY2

Ensayo de Clonogenicidad con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.

El ensayo de supervivencia clonogénica, nos permite cuantificar las células que tienen capacidad para formar colonias. Se utiliza para evaluar efectos de radiación, quimioterapia, desarrollo de drogas, farmacología, etc. En nuestro caso el ensayo se utilizó para determinar si la sobreexpresión del factor YY2 modificaba la capacidad de las células de formar colonias.

Como se puede observar en la Fig.17, se ven más colonias en las células que sobreexpresan al factor YY2. El número de colonias se muestra en la gráfica 5, mientras que en la gráfica 6 se observa la absorbancia. Se puede observar que las células que sobreexpresan al factor YY2 tienen mayor capacidad de clonogenicidad.

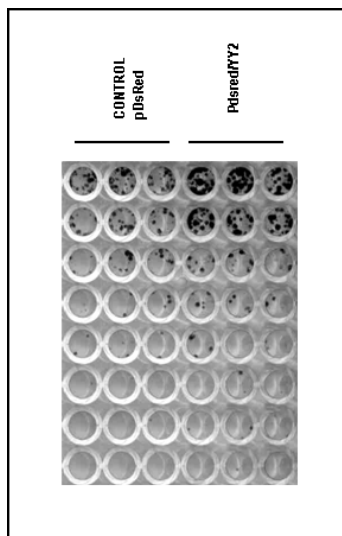
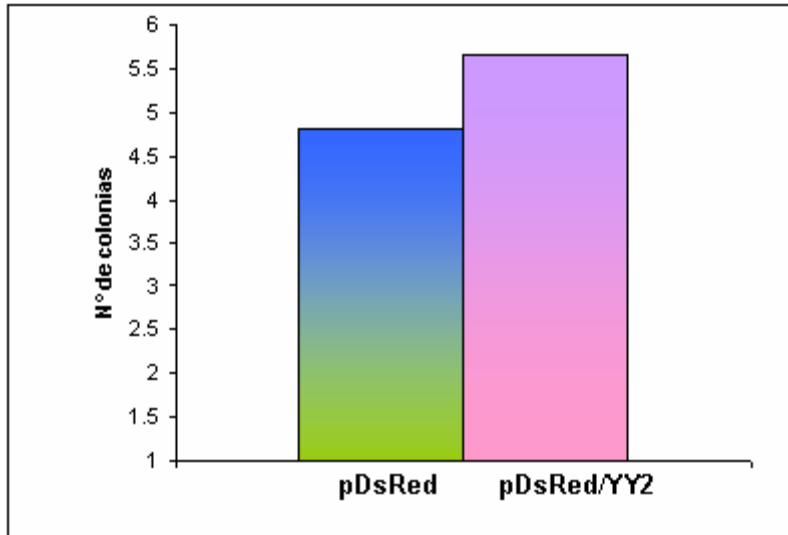
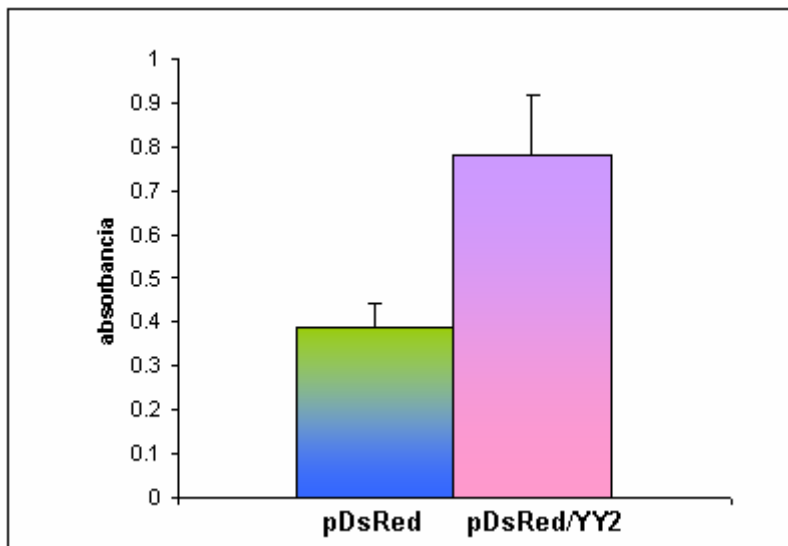


Fig. 17 Ensayo de clonogenicidad realizado durante 20 días.



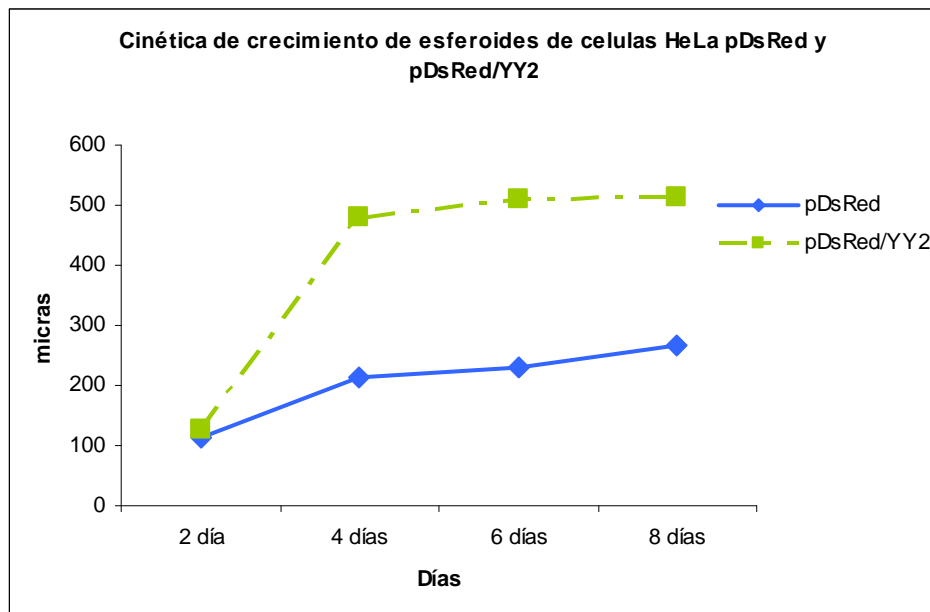
Gráfica 5. Promedio del número de colonias que se formaron en el ensayo de clonogenicidad, después de 20 días.



Gráfica 6. Promedio de la absorbancia para la clonogenicidad celular de pDsRed y pDsRed/YY2.

Cinética de crecimiento de los esferoides con las líneas celulares HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2.

Se realizó el cultivo en esferoides para poder determinar la capacidad que tienen las células que sobreexpresan al factor YY2 para formar esferoides. En la gráfica 7, se muestra la curva de crecimiento de los esferoides a los días 2, 4, 6 y 8, observándose una diferencia entre el crecimiento de los esferoides que sobreexpresan el factor YY2 y los controles. En la Fig.18 se puede observar que los esferoides que sobreexpresan al factor YY2 son de mayor tamaño y más compactos en los días 6 y 8 en comparación con los controles.



Gráfica 7. Cinética de crecimiento de los esferoides HeLa pDsRed y HeLa pDsRed/YY2. La curva se obtuvo del promedio de la medición de 10 esferoides.

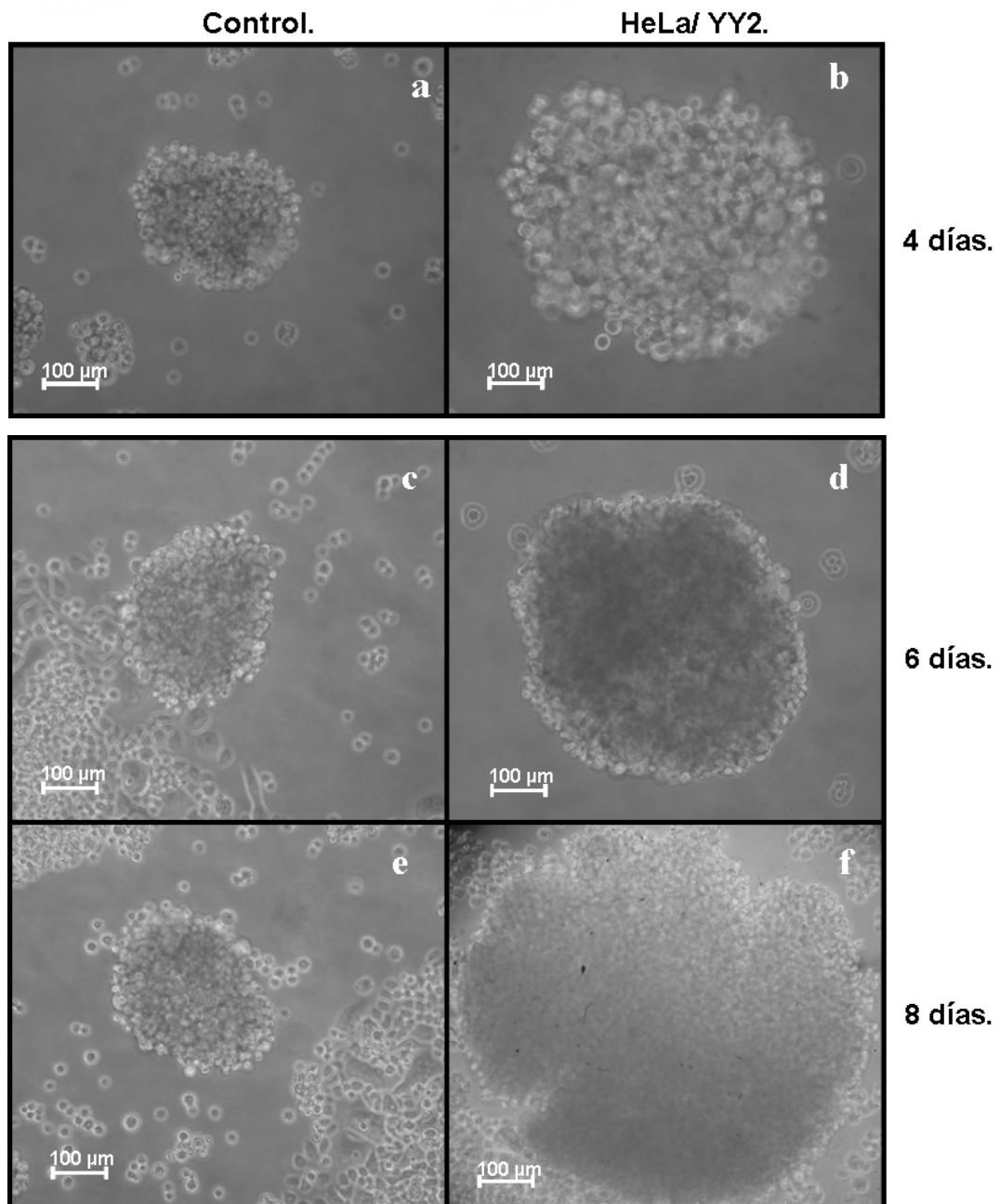


Fig. 18 Fotos de la cinética de crecimiento de los esferoides. Las fotos se obtuvieron a los 4, 6 y 8 días. Y se midieron con el micrómetro.

DISCUSIÓN.

El Yin Yang 2 es una copia de la retroposición del Yin Yang 1. Este factor, al igual que YY1, tiene la capacidad de activar o inhibir la transcripción de algunos genes involucrados en procesos como diferenciación, replicación y proliferación celular (Donohoe et al., 1999; Oei et al., 2001) .

El sitio de activación potente que presenta YY2, se encuentra en su dominio N-terminal y su sitio de represión se localiza en su dominio C-terminal. Algunos de los promotores a los cuales puede activar YY2 son: c-Myc, CXCR₄, p53 y c-Fos. (Nang N. *et al.*, 2004).

A la fecha los estudios realizados sobre el factor YY2 son muy pocos. En este trabajo se incluyó un panel de tejidos normales adultos y de líneas celulares para determinar en donde se encuentra expresado dicho factor a nivel de RNAm.

El factor YY2 se encontró expresado en todas las muestras analizadas y a diferencia de lo reportado por Nang *et al.*, 2004 en este proyecto, sí se encontró expresión en colon normal.

Se decidió sobreexpresar al factor YY2 en la línea celular HeLa y utilizar al plásmido pDsRed, ya que este plásmido puede ser transfectado en las células de mamíferos usando cualquier método estándar de transfección.

Una vez clonado el factor YY2 en sentido, se comprobó que se estuviera sobreexpresando el factor y se realizaron los experimentos de sensibilidad a apoptosis, proliferación, clonogenicidad, y crecimiento de esferoides.

En ambos estímulos apoptóticos (cisplatino y UVB), no se encontraron diferencias entre las viabilidades de las células control y las que sobreexpresaban al factor de YY2. Se determinó que las células murieron por apoptosis celular, debido a la formación de cuerpos apoptóticos observados en el microscopio. Sin embargo,

debido a la similitud que presenta el factor YY2 con el factor YY1 y a que se ha determinado que el factor YY1 sobreexpresado presenta resistencia a estímulos apoptóticos (Oeil *et al.*, 2001), en el presente trabajo se esperaba que con el factor YY2 pasaría lo mismo o existiera una diferencia entre las células que sobreexpresaban el factor y las controles, pero en general en base a nuestros resultados podemos decir que la sobreexpresión del factor YY2, no confiere a las células mayor resistencia a los estímulos empleados, así como tampoco las hace más susceptibles a estos.

Por otro lado en los ensayos de proliferación celular, al igual que en la apoptosis no se han realizado estudios en base al factor YY2, por lo cual nos basamos en experimentos realizados en la sobreexpresión de YY1, en donde se ha encontrado que existe una proliferación desenfrenada (Guo *et al.*, 1997; Oeil *et al.*, 2001), cuestión que se relaciona un poco con los datos obtenidos en el presente trabajo.

El análisis de la proliferación celular, se realizó para observar si el factor YY2 de igual manera que el factor YY1 participa en este proceso. Y efectivamente al realizar el ensayo de proliferación celular, se determinó que las células que sobreexpresaban el factor de YY2, presentaban una división mayor a partir del quinto día, esto nos permite suponer que el factor YY2, se encuentra implicado en las vías de supervivencia o proliferación celular, sin embargo se necesitarían realizar más experimentos que nos permitan corroborar que efectivamente el factor YY2 aumenta la proliferación, esto lo suponemos ya que al igual que el factor de YY1, el factor YY2, también participa modulando genes involucrados en este proceso.

El ensayo de supervivencia clonogénico, se utilizó para determinar si las células que sobreexpresaban el factor YY2, presentaban una mayor capacidad para formar colonias y se encontró que las células que sobreexpresaban este factor, presentaban mayor número de colonias formadas a lo largo de 20 días, lo cual nos indica que el factor de YY2, presenta ciertos mecanismos que le confieren mayor capacidad de clonogenicidad en comparación con nuestras células control.

El cultivo tridimensional en esferoides se eligió como una técnica más para comprobar si las células con sobreexpresión del factor YY2, presentaban mayor o menor capacidad para formar agregados celulares.

En la cinética de crecimiento, los esferoides sobreexpresados con YY2, se observaron más grandes y compactos. Probablemente esto se debió a que estas células proliferan más, como se pudo observar en el experimento de proliferación en monocapa. No se puede asegurar que este crecimiento sea debido a este aumento en la proliferación, se necesitarían realizar más experimentos para determinar que papel está desempeñando el factor YY2 en la formación de esferoides. Cabe mencionar que no hay reportes sobre los factores de transcripción YY1 y YY2, ni en los procesos de clonogenicidad, ni en la formación de esferoides. Por lo que, estos resultados nos proporcionan un acercamiento a la biología molecular de la proteína YY2 en procesos que son vitales para entender mejor al cáncer.

CONCLUSIONES.

- ☯ Se determinó la expresión del factor YY2 en tejidos normales adultos de colon, pulmón, hígado y riñón, así como en las líneas celulares de cáncer HeLa, MG63, U2OS, HEK293 y Sw48.
- ☯ Se logró exitosamente el diseño y la construcción del plásmido pDsRed/YY2.
- ☯ Se realizó la viabilidad celular con cisplatino y UVB. Los dos estímulos indujeron apoptosis y en las viabilidades no se observaron diferencias entre los controles y las células que sobreexpresaban el factor YY2.
- ☯ En el ensayo de proliferación celular se observó que las células que tenían sobreexpresado el factor YY2, presentaban una mayor proliferación a partir del quinto día en comparación con las células control.
- ☯ En el ensayo de clonogenicidad, la sobreexpresión del Factor YY2 les confirió a las células mayor capacidad de formar colonias.
- ☯ En el cultivo tridimensional, los esferoides con Yy2 sobreexpresado, fueron más grandes y más compactos en comparación con los controles.

BIBLIOGRAFIA.

Alberts B. Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Biología Molecular de la célula*. 4a edición, 2002.

Aoto T, Saitoh N, Sakamoto Y, Watanabe S, Nakao M. Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and required for S-phase progression. *The Journal of biological Chemistry*, 2008 May 2.

Cabrera CM., López-Nevot MA., Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel, *REB Oncología*, 2006; 29 (7):291-298.

Carmen Martha Elinos-Báez, Vilma Maldonado, Jorge Meléndez-Zajgla, Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis, *Gaceta Médica de México*, 2001, 493-499.

Chunqing, L., Xiaochen, L., Lisa, S., Joomyeong, K., Rapid evolution of a recently retroposed transcription factor YY2 in mammalian genomes. *Genomics*. 2006 Mar;87(3):348-55. Epub 2005 Dec 27.

Desoize B, Jardillier J., Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Critical reviews in oncology/hematology*, 2000 Nov-Dec;36(2-3):193-207.

Donohoe ME, Zhang X, McGinnisL, BiggersJ, Li E, Shi Y., Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Molecular and cellular biology*, 1999 Oct;19(10):7237-44.

Flanagan JR, Becker KG, Ennist DL, Gleason SL, Driggers PH, Levi BZ, Appella E, Ozato K., Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Molecular and cellular biology*, 1992 Jan;12(1):38-44.

Folkman J, Moscona A., Role of cell shape in growth control, *Nature*. 1978 Jun 1; 273 (5661):345-9.

Frankko AJ., Sutherland RM., Oxygen diffusion distance and development of necrosis in multicell spheroids. *Radiation Research*. 1979 Sep; 79(3):439-53.

Gallardo JC., Espinosa M., Meléndez J., Maldonado V., Esferoides Tumorales Multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas, *REB* 25(4): 101-107, 2006.

Gordon S., Akopyan G., Garban H., Bonavida B., Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*. 2006 Feb 23;25(8):1125-42.

Guo B., Stein JL., Van Wijnen AJ., Stein GS., ATF1 and CREB trans-activate a cell cycle regulated histone H4 gene at a distal nuclear matrix associated promoter element. *Biochemistry*. 1997 Nov 25;36(47):14447-55.

Haga T., Uchide N., Tugizov S., Palefsky JM., Role of E-cadherin in the induction of apoptosis of HPV16-positive CaSki cervical cancer cells during multicellular tumor spheroid formation. *Apoptosis*. 2008 Jan;13(1):97-108.

Hariharan N, Kelley DE, Perry RP. Delta, a transcription factor that binds to downstream elements in several polymerase II promoters, is a functionally versatile zinc finger protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991 Nov 1;88(21):9799-803.

Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J., Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems*. 2006 Feb-Mar;83(2-3):81-90. Epub 2006 Jan 19.

Houbaviy et al., 1996, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank <http://www.pdb.org>, accessed January 2005.

Jordán J., Apoptosis: muerte celular programada, *OFFARM*, 2003, Vol. 22 Núm 6, junio.

Jurgens, G. A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 1985, 316, 153–155.

Kawano K, Katak SS, Murai M, Yao CC, Kramer RH. Integrin $\alpha 3\beta 1$ engagement disrupts intercellular adhesion. *Experimental Cells Research* 2001 Jan 15;262(2):180-96.

Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R., Multicellular tumour spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *International Journal of Experimental Pathology* 1998 Feb;79(1):1-23.

McNeil S, Guo B, Stein JL, Lian JB, Bushmeyer S, Seto E, Atchison ML, Penman S, van Wijnen AJ, Stein GS., Targeting of the YY1 transcription factor to the nucleolus and the nuclear matrix in situ: the C-terminus is a principal determinant for nuclear trafficking, *Journal of Cellular Biochemistry*, 1998 Mar 15;68(4):500-10.

Meléndez ZJ, Maldonado LV. Cisplatino. Avances recientes en el estudio de su mecanismo de acción, *Rev Inst Nal Cancerol* 1998; 44(1): 28-34. México.

Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumors. *Nature Reviews Cancer*, 2006 Aug;6(8):583-92.

Mueller-Klieser W., Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications, *The American Journal of Physiology*. 1997 Oct; 273 (4 Pt 1):C1109-23.

Nguyen N., Zhang, X., Olashaw, N., and Seto, E., Molecular Cloning and Functional Characterization of the Transcription Factor YY2, *The journal of biological chemistry*, 2004 Vol. 279, No. 24, Issue of June 11, pp.

Oei SL, Shi Y., Transcription factor Yin Yang 1 stimulates poly (ADP-ribose)ation and DNA repair. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2001 Jun 8;284(2):450-4.

Park K., Atchison ML., Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991 Nov 1;88(21):9804-8.

Philchenkov A., 2006, Apoptosis, cancer therapy, and beyond, *Cell Death and Differentiation* 2006, 13, 2004–2005.

Santini MT, Rainaldi G., Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology*. 1999 May-Jun;67(3):148-57.

Sauvageau M., Sauvageau G., Polycomb group genes: keeping stem cell activity in balance. *PLoS Biology*. 2008 Apr 29;6 (4):e113.

Shi Y, Lee JS, Galvin KM. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997 Apr 18;1332(2):F49-66

Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T., Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell*. 1991 Oct 18;67(2):377-88.

Thomas MJ, Seto E., Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?, 1999 Aug 20;236(2):197-208.

V. Janssens, C. Van Hoof, I. De Baere, W. Merlevede And J. Goris,1999, "Functional Analysis Of The Promoter Region Of The Human Phosphotyrosine Phosphatase Activator Gene: Yin Yang 1 Is Essential For Core Promoter Activity", *Biochem. J.* (1999) 344, 755-763.

Valk-Lingbeek ME., Bruggeman SW., van Lohuizen M., Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004 Aug 20;118(4):409-18.

Viles JH., Patel SU., Mitchell JB., Moody CM., Justice DE., Uppenbrink J., Doyle PM., Harris CJ., Sadler PJ., Thornton JM., Design, synthesis and structure of a zinc finger with an artificial beta-turn, *Journal of Molecular Biology.* 1998 Jun 19;279(4):973-86.

Walenta S, Feigk B, Wachsmuth I, Dunkern T, Degani H, Mueller-Klieser W. Differential changes in purine nucleotides after Doxorubicin treatment of human cancer cells in vitro. *International Journal of Oncology.* 2002 Aug;21(2):289-96.

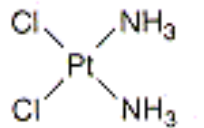
Whitcomb SJ, Basu A, Allis CD, Bernstein E. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends in Genetics.* 2007 Oct;23(10):494-502. Epub 2007 Sep 7.

Yao YL, Dupont BR, Ghosh S, Fang Y, Leach RJ, Seto E. Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1. *Nucleic Acids Research.* 1998 Aug 15;26(16):3776-83.

ANEXOS.

Cisplatino.

El cisplatino es un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado cuyo mecanismo de acción no está completamente dilucidado. Su efecto tóxico está relacionado con su capacidad para dañar el ADN nuclear, provocando la formación de puentes entre bases de esta molécula denominados aductos. La formación de estos aductos, de no ser reparados, induce una serie de cascadas de reconocimiento del ADN y de respuesta celular al estrés que finalmente llevan a la muerte celular por apoptosis. (Meléndez ZJ., 1998).



CISPLATINO

UVB.

La luz solar es energía radiante electromagnética compuesta principalmente por el espectro de luz ultravioleta (100 a 400 nm), luz visible (400 a 760 nm) e infrarroja (760 a 1.800 nm), aunque también están presentes longitudes de onda corta (ionizantes), y onda larga (microondas y radiofrecuencia).

La radiación UV se divide en tres bandas: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320), y la UVC (200 a 280 nm). La UVA no es filtrada por la capa de ozono en el mismo grado que la UVB y la UVC, y cantidades suficientes de la misma penetran a través de las nubes y de los vidrios.

Una gran variedad de agentes que producen daño en el DNA inducen elevados niveles de p53. Permitiendo a los mecanismos de reparación celulares eliminar las lesiones en el DNA, o bien se induce apoptosis en aquellas células que presentan excesivo daño en el DNA (Cabrera M, 2006).

ABREVIATURAS.

cDNA: DNA complementario.

LiCl.: Cloruro de litio.

DEMEM: Medio MEM modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

dNTPS: Deoxinucleótidos.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

Fase G2: Segunda fase de intervalo o GAP.

Fase M: Fase de Mitosis.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

IAP: Proteínas inhibidoras de apoptosis.

PCR: Reacción en Cadena de la DNA polimerasa

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.

RT: Reverso transcriptasa.

RING: Anillo de dedo de zinc.

UVB: radiación ultravioleta b.

δ:Delta.

ABREVIATURAS DE UNIDADES DE MEDICIÓN.

g: Gramos.

Mg: Miligramos.

μ g: Microgramos.

ml: Mililitros.

μ l: microlitros.

M: Moles.

mM: Milimoles.

μ M: Micromoles.

nM: Nanomoles

picoM: Picomoles.

pb: Pares de bases.

h: Horas.

min: minutos (')

seg: segundos (")

1Kb = 1000 pb.