



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA.

**EVALUACION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA DE
MULTIRRESISTENCIA A LAS DROGAS Y EL FACTOR DE
TRANSCRIPCION YIN-YANG-1 (YY1) EN PACIENTES CON
LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
ANA BELÉN TIRADO RODRÍGUEZ**



México, DF. 2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Enrique Ortega Soto

VOCAL: Profesor : Araceli Mendieta Rergis

SECRETARIO: Profesor: Sara Huerta Yepez

1er. SUPLENTE Profesor: Nohemi Salinas Jazmín

2º SUPLENTE Profesor: Julio César Martínez Álvarez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: _____

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCLÓGICAS, HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

ASESOR DEL TEMA: SARA HUERTA YEPEZ

SUSTENTANTE (S): ANA BELÉN TIRADO RODRÍGUEZ



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA.



**EVALUACION DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA DE
MULTIRRESISTENCIA A LAS DROGAS Y EL FACTOR DE
TRANSCRIPCION YIN-YANG-1 (YY1) EN PACIENTES CON
LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

ANA BELÉN TIRADO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

SARA HUERTA YEPEZ

El Presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la dirección de la Dra. Sara Huerta Yopez y en el Departamento de de Hemato-oncología del mismo hospital, bajo la dirección de la Dra. Elisa Dorantes Acosta y la Dra. Aurora Medina Sanson.

Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación local del Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo el número de proyecto (HIM/2009/029). Se reconoce al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado a ABTR durante la realización de esta tesis de licenciatura a través de la beca número 13376 durante el periodo abril-diciembre 2009. Este Trabajo recibió financiamiento mediante el proyecto CONACYT 2007/C01/69789.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento

A Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

A mis padres, por apoyarme y respaldarme en este gran proyecto. Han sido ellos quienes con el ejemplo de día a día me han enseñado que puedo llegar tan lejos como lo desee. Gracias por colocar amorosamente junto conmigo cada uno de los pilares que ahora me sostienen y que gracias a ellos he llegado tan lejos. En especial a mi madre por ser mi guía y por compartir mis triunfos y derrotas día con día, así como mi lucha constante.

A mis hermanos, por la compañía y el apoyo que me brindan, se que cuento con ellos siempre.

Le Agradezco a mis tíos, mis abuelos y familiares por todo el apoyo que me han brindado.

A mis amigos, Christian, Jonathan, Sofía, Adrian, Adriana, Heli, Tania D.,Oscar, Alex, Yoneli, Gaby, Jesús, Guille, Aniela, Adrianita, a todas esas personitas que han sido, son y siempre serán parte fundamental de mi vida, ya que están en mi corazón y que gracias a ellos hoy soy una mejor persona, los quiero muchísimo, gracias por compartir mis alegrías, tristezas, gracias simplemente por formar parte de mi vida. Arriba la Jarribanda!!!!

A mi Directora de Tesis, Dra. Sara Huerta Yopez por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A la Dra.Carmen Maldonado Bernal y a todos mis compañeros de la Unidad de Investigación en enfermedades Oncológicas del Hospital Federico Gómez, por su continuo y afectuoso aliento, sí como su apoyo y comprensión.

A Gaby, Jesús, Guille, Adriana y Aniela por su calidez y compañerismo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos y sobre todo por su amistad e incondicional apoyo.

A la M. en C. María Cristina Negrete García, por ser una gran maestra, amiga y científica, la cual me brindó la oportunidad de dar mis primeros pasos en la investigación, así como todas las personas que me tendieron la mano en el INER, Rosalia, Elba, Delia, Alejandro, Víctor, Yoneli, Mauricio, Dr. Tinajero, Felipe, César, Dr.Guani, la Dra. García, Dulce, el Dr. Gutiérrez, La Dra.Santos, el Dr.Edgar, Pepé, el Dr.Fuentes y el Dr.Terán.

A ti Francisco, Por apoyarme incondicionalmente e ilusionarte junto conmigo en todos mis proyectos, por creer en mis capacidades, por hacer tuyos mis sueños, por siempre tener tu corazón y tus brazos abiertos, por siempre darte el tiempo de escucharme, pero principalmente por ser ese gran hombre que hombro a hombro comparte su vida conmigo llenándola de calidez y alegría.

Gracias por ser lo mejor de mi vida,

Este trabajo es de ustedes.

Los quiero mucho.

ÍNDICE

	ABREVIATURAS PRINCIPALES.....	1
1.	RESUMEN.....	2
2.	INTRODUCCION.....	4
2.1.	Mortalidad Infantil.....	5
2.2.	Leucemia.....	6
2.3.	Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	8
2.3.1.	Clasificación de las LLA.....	10
2.3.2.	Patogénesis.....	11
2.3.3.	Diagnóstico.....	14
2.3.4.	Tratamiento.....	15
2.3.5.	Grupos de riesgo	15
2.3.6.	Factores Pronóstico.....	18
2.3.7.	LLA resistente al tratamiento y recaída.....	18
2.3.8.	Resistencia a fármacos en LLA.....	19
2.4.	Gen <i>mdr1</i>	20
2.5.	Factores de Transcripción.....	21
2.5.1.	Mecanismos de acción de los Factores de Transcripción.....	22
2.5.2.	El Factor de Trascrición YY1.....	24
2.6.	Apoptosis y YY1.....	25
2.6.1.	Vía extrínseca.....	25
2.6.2.	Vía intrínseca o mitocondrial.....	25
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
4.	HIPOTESIS.....	30
5.	OBJETIVO.....	31
5.1.	General.....	31
5.2.	Específico.....	31
6.	MATERIAL Y METODOS.....	32
6.1.	Pacientes.....	32
6.2.	Criterios.....	32

6.2.1.	Criterios de inclusión.....	32
6.2.2.	Criterios de exclusión.....	33
6.2.3.	Criterios de eliminación.....	33
6.3.	Aislamiento de progenitores linfo-hematopoyéticos.....	33
6.4.	Purificación de células de sangre periférica.....	34
6.5.	Preparación de laminillas.....	34
6.6.	Inmunocitoquímica.....	35
6.7.	Cuantificación de células positivas inmunoteñidas.....	36
6.8.	Transfección.....	36
6.8.1	Tranfección de las líneas celulares PC3 y COS7 con el DNA plasmidico.....	37
6.9.	Análisis Estadístico.....	38
7.	RESULTADOS.....	39
7.1.	Análisis Clínico.....	39
7.2.	Evaluación de la expresión de YY1 y Gp-170.....	39
7.3.	Evaluación de la expresión de YY1 y Gp-170 en los diversos estadios de diferenciación linfoide.....	40
7.4.	Asociación de la expresión de YY1 y gp-170 en LLA de alto riesgo.....	41
7.5.	Evaluación de la participación de YY1 en la regulación transcripcional del gen que codifica para Gp-170.....	42
8.	DISCUSION.....	43
9.	CONCLUSIONES.....	47
10.	ANEXOS.....	48
10.1.	Tabla1. Características Clínicas y Parámetros que determinan el grado de riesgo de LLA durante la infancia.....	48
10.2.	Fig.1. Incremento de la Expresión de YY1 y Gp-170 en Pacientes con LLA.....	49
10.3.	Fig.2. Incremento de la expresión YY1 y de Gp-170 en pacientes con LLA.....	50
10.4	Fig.3. Correlación positiva entre YY1 y Gp-170.....	51

10.5	Fig.4. Incremento de la expresión de YY1 y Gp-170 en células B precursoras de pacientes con LLA.....	52
10.6	Fig.5. Incremento de la expresión de Gp-170 y YY1 en diferentes precursores de células B.....	53
10.7.	Fig.6. Asociación de la expresión de YY1 y Gp-170 en LLA de alto riesgo.....	54
10.8.	Fig.7. Aumento en la expresión de YY1 y Gp-170 después de la quimioterapia.....	55
10.9.	Evaluación final de la funcionalidad de los plásmidos.....	56
11.	REFERENCIAS.....	57

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina o Adenosín Trifosfato
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	B-cell lymphoma 2(BCL-2)-associated protein X
Bcl-2	B cell Leukemia/Lymphoma-2
CMN	Células Mononucleares
CMV /pGL3	Plásmido que contiene la secuencia del promotor de citomegalovirus
COS 7	Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> .
DAB	Diamino Bencidina
DR5	Receptor de muerte 5
FADD	Factor associated death domain
Fas	CD95(FAS/APO-1) Antígeno de apoptosis
Gp-170	Glicoproteína 170
GTFs	Factores de Transcripción generales.
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MDR	Gen de Multirresistencia a las drogas
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
NK	Células asesinas naturales
OMS	Organización de Mundial de la Salud
PBS	Phosphate buffered Saline
Raidd	Receptor associated interleukine death domain
SMAC/DIABLO	Second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pl.
TESS	Transcription Element Search System

TNF	Factor de necrosis tumoral
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	Apoptosis-inducing ligand receptor

1. RESUMEN

En la actualidad, el cáncer es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad, anualmente se registran en todo el mundo más de 10 millones de nuevos casos de cáncer y más de 6 millones de defunciones por esta enfermedad ⁽²⁾.

Se estima que cada año se diagnostican 15 casos de cáncer infantil por cada 100.000 niños menores de 15 años. La mitad de estos, aproximadamente, se originarán en menores de 4 años. Los tipos de tumores que se presentan en la infancia son distintos de los que padecen los adultos. En los niños, los tumores más frecuentes son las leucemias ⁽³⁾. La Leucemia se define como una proliferación maligna de células de la médula hematopoyética, en que predominan los glóbulos blancos y sus precursores. Dentro de las leucemias, le leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia en todo el mundo, con una incidencia de alrededor de 4.8 casos por 100 000 habitantes de 0 a 18 años. Anualmente se diagnostican en los EUA alrededor de 2 500 casos de LLA por 100 000 habitantes ⁽⁹⁾. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se atienden cada año alrededor de 100 casos nuevos de LLA y esta neoplasia constituye el 34.4% de todos los casos de cáncer tratados en nuestra institución ⁽¹⁰⁾. Existen diferentes tipos de tratamiento para niños con LLA, como es la quimioterapia y la radioterapia, el tratamiento más utilizado es la quimioterapia cuyo objetivo es provocar una remisión sin evidencia de células blásticas leucémicas ni en la sangre ni en la médula ósea, y así restablecer la producción normal de células, mediante el uso de medicamentos, induciendo la destrucción de las células cancerosas o evitando su multiplicación. Entre el 35 y 40% de los casos el tratamiento dura en promedio 2.5 años ⁽⁸⁾.

La mayoría de los niños con LLA se cura, sin embargo un porcentaje importante (25-30%) desarrollan resistencia al tratamiento ⁽⁸⁾. Se han identificado diferentes tipos de resistencia a agentes citotóxicos, la participación

de transportadores de membrana juega un papel importante dentro de estos mecanismos de resistencia ⁽¹⁷⁾. Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a las drogas quimioterapéuticas es la presencia de la glicoproteína P-170 (Gp-170) resultante de la expresión del gen *mdr-1* en las células leucémicas. La actividad de la bomba dependiente de energía de la Gp-170 permite la eliminación de drogas relacionadas y no relacionadas con la quimioterapia, causando resistencia al tratamiento. La exposición a drogas quimioterapéuticas induce la sobreexpresión de la Gp-P 170 en células blásticas ⁽¹⁸⁾.

Se ha observado que las células leucémicas CD34+ que coexpresan MDR-1 tienen un aumento de la actividad funcional de la Gp-170 que les confiere una mayor resistencia a drogas, correlacionando con una menor respuesta al tratamiento quimioterapéutico y presencia de niveles elevados de enfermedad residual mínima en los pacientes ⁽¹⁸⁾.

El factor de transcripción YY1 juega un papel fundamental en procesos biológicos como embriogénesis, diferenciación, proliferación celular y carcinogénesis. Recientes estudios realizados por nuestro grupo de trabajo en colaboración con la UCLA han demostrado que la sobre-activación de YY1 en células tumorales representa un mecanismo de resistencia a la apoptosis. La participación de YY1, en los mecanismos de resistencia a drogas es aún desconocida, aunque nuestra investigación reciente ha determinado que el promotor completo del gen *mdr1* contiene 4 sitios específicos de unión para este factor de transcripción; lo que hace probable que YY1 actúe también como un regulador de este gen. Consecuentemente, resulta importante evaluar si existe conexión funcional entre YY1 y Gp-170 y si su función es influenciada en la LLA.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Mortalidad Infantil

En los últimos años la epidemiología de las patologías infantiles se ha visto modificada de forma importante. Hace quince años las principales causas de mortalidad infantil estaban relacionadas con procesos infecciosos agudos, principalmente gastrointestinales y de tipo respiratorio; pero actualmente el cáncer representa una de las principales causas de mortalidad en niños ⁽¹⁾.

La leucemia es el cáncer más común en los niños y adolescentes y representa aproximadamente la tercera parte de todos los casos de cáncer en niños menores de 15 años y la cuarta parte de los casos de cáncer que ocurren antes de los 20 años.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es más común en la infancia, y alcanza su mayor incidencia entre las edades de 2 a 3 años (> 80 por millón por año), con tasas que disminuyen a 20 por millón entre niños de 8 a 10 años de edad. La incidencia de LLA en pacientes de 2 a 3 años de edad es aproximadamente 4 veces mayor que entre niños menores de 2 años y casi 10 veces mayor que entre los de 19 años de edad.⁽⁵⁰⁾

Las defunciones registradas en México en el año 2001 en el grupo de edad de 1 a 4 años ocurrieron 232 muertes para una tasa de 2.69 por 100.000 habitantes, para el grupo de 5 a 14 años el número de muertes por leucemias fue de 588 para una tasa de 2.60 por 100.000 habitantes ⁽¹⁾. (Tabla 1)

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en edad escolar ⁽¹⁾.

Principales causas de mortalidad en edad escolar (de 5 a 14 años), 2005.				
Nacional				
Orden	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	Total	6,773	30.6	100.0
1	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	963	4.3	14.2
2	Leucemia	602	2.7	8.9
3	Ahogamiento y sumersión accidentales	292	1.3	4.3
4	Agresiones (homicidios)	257	1.2	3.8
5	Infecciones respiratorias agudas bajas	195	0.9	2.9
6	Malformaciones congénitas del corazón	191	0.9	2.8

^{1/} Tasa por 100,000 habitantes

No se incluyen defunciones de residentes en el extranjero

Fuente: Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAPO, 2002. Proyecciones de la Población de México, 2000 - 2050.

2.2 Leucemia

Se define como una proliferación maligna de células de la médula hematopoyética, en que predominan los glóbulos blancos y sus precursores. Las leucemias se caracterizan por infiltración difusa de la médula hematopoyética por células tumorales, presencia de células tumorales en la sangre (10.000 a más de 500.000 leucocitos por mm cúbico en sangre circulante), e infiltración tumoral de distintos órganos por células tumorales dispersas en focos mal delimitados o en forma difusa. La manifestación clínica de las leucemias se debe principalmente a las consecuencias de la ocupación de la médula hematopoyética y a la falta de leucocitos funcionalmente adecuados.

Tabla 3. Frecuencia de neoplasia en pacientes pediátricos ⁽⁴⁾.

Diagnóstico	Instituto Nacional de Pediatría %	Hospital Infantil de México FG %	Estudio multicéntrico en México %	USA %
Leucemia	35	40.9	34.4	30
Linfoma	16	12.4	19.5	13
Retinoblastoma	12	5	8.5	3

De acuerdo a la evolución clínica, las leucemias se dividen en:

- **Agudas:** Trastorno de la célula progenitora caracterizado por la proliferación neoplásica y la acumulación de células hematopoyéticas inmaduras en la médula ósea. Las células son incapaces de diferenciarse a células sanguíneas funcionales normales. Hay clasicamente blastos en la sangre periférica.⁽⁵³⁾
- **Crónicas:** Son procesos hematológicos de larga evolución, en los que existe un aumento anómalo de células sanguíneas, más o menos maduras, y fácilmente identificables.⁽⁵²⁾

Según el tipo de leucocito que prolifera las leucemias se clasifican de manera general en dos grupos principales **leucemia mieloide** y **leucemia linfoide**⁽⁷⁾.

2.3. Leucemia Linfoblástica aguda (LLA).

La LLA es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación desordenada de células inmaduras de la línea linfoide (blastos) que surgen de la célula madre (stem cell) en la médula ósea⁽⁵⁰⁾.

La proliferación desordenada de blastos en la médula ósea puede extender la presencia de blastos en la sangre, los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, el sistema nervioso central, los testículos u otros órganos ⁽⁵⁰⁾.

La LLA es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia en todo el mundo, con una incidencia de alrededor de 4.8 casos por 100 000 habitantes de 0 a 19 años. Anualmente se diagnostican en los EUA alrededor de 2 500 casos de LLA por 100 000 habitantes ⁽⁹⁾. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se atienden cada año alrededor de 100 casos nuevos de LLA y esta neoplasia constituye el 34.4% de todos los casos de cáncer tratados en nuestra institución ⁽¹⁰⁾.

En general, la incidencia de la LLA es mayor en niños de entre 3 y 5 años de edad y es ligeramente más común en varones (relación entre niño: niña de 1.4:1.0). Así mismo, en la raza blanca se observa una mayor frecuencia, que en la raza negra, lo cual podría reflejar una diferente susceptibilidad genética. ⁽⁵⁴⁾

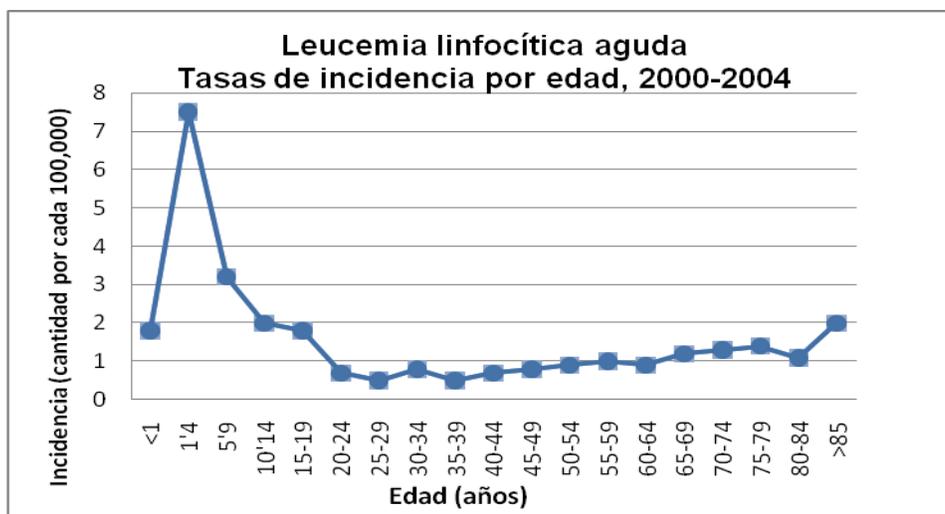


Fig.1 El eje horizontal muestra intervalos de cada 5 años de edad. El eje vertical muestra la frecuencia de nuevos casos de LLA por cada 100,000 personas. Note que el riesgo de padecer LLA es mayor durante los primeros 5 años de vida. También se observa un aumento de la incidencia entre las personas mayores. (fuente: Surveillance, Epidemiology, and End Results [SEER] Program, 2000-2004, National Cancer Institute, 2007⁽¹¹⁾).

2.3.1 Clasificación de las LLA

El estudio de diversas características detectables en las células leucémicas ha permitido la clasificación de estas neoplasias desde los puntos de vista morfológicos e inmunológicos.

- Clasificación morfológica: Se basa en los criterios de la Sociedad Franco-Americano-Británica (FAB), que analiza características citológicas como el tamaño, forma, relación núcleo-citoplasma, presencia de vacuolas y gránulos en el citoplasma, características del núcleo y nucléolos⁽¹³⁾ como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación Morfológica de LLA.

Tipo	Características
LLA 1	Blastos pequeños con escaso citoplasma y poca variación de tamaño y forma de célula a célula. El núcleo es redondo y habitualmente con un único nucléolo pequeño
LLA 2	Células blásticas más grandes y con citoplasma más abundante que en la L1. Tamaño y forma de las células muy heterogéneas. El núcleo puede tener una forma irregular y con frecuencia tiene múltiples nucléolos.
LLA 3	Células grandes con citoplasma intensamente basófilo y con frecuencia vacuolado. Núcleo redondo de cromatina fina y nucléolo basófilo a menudo múltiple. Esta morfología es común a la leucemia asociada al linfoma de Burkitt.

Clasificación inmunológica: Se basa en la expresión de los antígenos de superficie de membrana o de los componentes citoplasmáticos que han permitido identificar y clasificar a las enfermedades linfoproliferativas según su

origen celular y su estadio de diferenciación ⁽⁵⁵⁾, así en general, las LLA infantil se pueden clasificar en:

a) **Pre- B:** Linfoblastos con morfología L1, según la FAB. Estas células son positivas tanto para las inmunoglobulinas citoplasmáticas (clg) como para CD19, CD22, HLA-DR, CD10. Aproximadamente el 80% de casos pediátricos con LLA tienen este inmunofenotipo. En este grupo se identifican 3 subtipos inmunológicos: pre-B temprana, pre-B común y pre-B tardía, como se observa en la Tabla 4.

b) **Células B:** Los linfoblastos con este fenotipo tienen una morfología característica, designada por la FAB como L3 y son positivas para las inmunoglobulinas de superficie (slg). Este subtipo de leucemia está presente en el 3% de los casos de LLA infantil. En estos pacientes, pueden observarse tumores extramedulares y más del 90% de los casos presentan cadenas pesadas μ de las inmunoglobulinas (Igs) en la superficie celular. Alrededor de las dos terceras partes de ellos, también expresan cadena ligera κ y el resto cadena ligera λ . Las LLA de células B parecen representar linfomas de Burkitt avanzados en fase leucémica.

c) **Células T:** Este subtipo de LLA, se identifica por la expresión de antígenos de superficie asociados a las células T. Presentan positividad para CD7, CD5 o CD2. Las leucemias de células T generalmente se presentan en los varones y en grupos de edad avanzada y se caracterizan por la gran masa de células leucémicas asociado al desarrollo de infiltración al mediastino.

d) **Pre-B transicionales:** Los linfoblastos expresan tanto cadenas pesadas de Igs citoplásmicas como de superficie y proteínas de cadena ligera ⁽⁵³⁾

Tabla.4 Clasificación inmunológica de la LLA Infantil ⁽⁵⁴⁾.

Tipo de LLA	CD19	CD10	CD2	clg	slg	CD5
Pre-B temprana	+	-	-	-	-	-
“Común”	+	+	-	-	-	-
Pre-B-Tardía	+	+	-	+	-	-
Cel-B	+	+	-	+/-	+	-
Cel-T	-	+/-	+	-	-	+
Pre-B transicional	+	+	-	+	+	-

2.3.2 Patogénesis

Aunque la causa o las causas de la LLA no se conocen con precisión, se sabe que hay diversos factores que predisponen a sufrir estas hemopatías. Entre ellos destacan los genéticos, las inmunodeficiencias y ciertos factores ambientales⁽¹⁴⁾.

Diversos reportes apoyan la participación de factores genéticos en el desarrollo de las leucemias agudas. Las leucemias agudas son más frecuentes en pacientes afectados de cromosopatías, tanto numéricas como estructurales. Entre ellas destacan los síndromes de Down, Klinefelter, Bloom y de Fanconi. También se registra una mayor propensión a presentar una leucemia aguda en enfermedades que cursan con inmunodeficiencia, entre las que destacan la agammaglobulinemia.

Existen fuertes evidencias de que ciertos factores ambientales influyen en la patogénesis de las leucemias agudas. Entre ellos cabe mencionar las radiaciones ionizantes en la leucemogénesis. El evento mas claro en donde se reporto la mayor frecuencia de leucemias agudas registradas fue después de las

explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki o tras los accidentes nucleares como el de Chernobyl ⁽¹⁴⁾.

Por otro lado, diversos fármacos o sustancias químicas se han implicado en la patogénesis de LLA. Los más importantes son el bencol y sus derivados, otros compuestos orgánicos como los pesticidas, los fármacos inmunodepresores y los citostáticos, en especial los agentes alquilantes (sobre todo la mostaza nitrogenada, melfalán y clorambucilo) ⁽¹⁴⁾.

Recientemente también se ha observado una mayor frecuencia de leucemias agudas en pacientes que han recibido etopósido o tenipósido, las cuales tienen unas características citológicas y citogenéticas peculiares (translocación y reordenamientos que afectan a 11q23 y 21q22) ⁽¹⁴⁾.

2.3.3 Diagnóstico

Es muy importante la realización de una historia clínica detallada atendiendo a historia familiar de enfermedades oncológicas, exposición a tóxicos medulares, y atención a signos y síntomas propios de anemia, neutropenia y trombocitopenia. En el examen físico hay que valorar grado de palidez, evidencia de sangrado, signos de focalidad infecciosa. Es muy importante la exploración de linfadenopatías en territorios no usuales en niños (supraclaviculares, y auriculares posteriores); también presencia o no de masas y megalias abdominales ⁽¹⁵⁾.

Las células de la sangre y/o las de la médula ósea también se usan para:

- 1) Estudios de la cantidad y el tamaño de los cromosomas (examen citogenético).** El examen de las células leucémicas mediante técnicas citogenéticas permite la identificación de anomalías cromosómicas o genéticas en las células. Mediante el

cariotipo, la determinación del contenido de DNA y el análisis molecular por Reacción en Cadena de Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR) o Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH), ha sido posible la identificación de diversas alteraciones cromosómicas que se han clasificado en numéricas y estructurales. Las de tipo numérico se dividen en 7 grupos: hiperdiploide con 47 a 50 cromosomas, hiperdiploide con más de 50 cromosomas (o índice de DNA mayor de 1.16), hipodiploide con 30 a 40 cromosomas, hipodiploide con 41 a 45 cromosomas, casi haploide, casi tetraploide, casi triploide yseudodiploide. Dentro de las alteraciones estructurales se pueden encontrar traslocaciones, deleciones o inversiones. La traslocación t(12;21) ha sido descrita como la anormalidad genética más frecuente en LLA, que ocurre aproximadamente en 20% de los pacientes; la segunda en frecuencia es la t(1;19) y en tercer lugar se encuentra la t(9;22) o cromosoma Philadelphia, presente en 3 a 5% de los pacientes. La traslocación t(4; 11) se presenta aproximadamente en 2% de los casos, por lo general es encontrada en lactantes menores de 12 meses y en leucemias de linaje mixto⁽⁵⁶⁾ como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Traslocaciones cromosómicas más frecuentes en LLA ⁽⁵⁶⁾.

Traslocación	Frecuencia	Genes Afectados	Características
t(1:19)(q23;p13)	5-6%	E2A-PBX1	Fenotipo pre-B. Hiperleucositosis. Pronósticos pobre, necesario tratamiento intensivo.
t(9:22)(q34;p11)	3-5%	BCR-ABL	Cromosoma Philadelphia. Mal pronóstico. Hiperleucositosis.
t(4:11)(q21;p23)	2%	MLL-AF4	Estirpe B, asociado a LLA lactante. Hiperleucositosis. Pronóstico pobre.

t(12:21)(p13;q22)	25% de LLA pre-B	TEL-AML	Fenotipo B. buen pronóstico.
-------------------	------------------	---------	------------------------------

2) Pruebas o análisis citoquímico: se refiere a la tinción in Vitro de las células, la cual permite el examen microscópico de la composición química celular. Las reacciones de tinción citoquímicas son de dos tipos, enzimáticas y no enzimáticas. El grupo enzimático incluye tinciones para mieloperoxidasa, esterasas, y fosfatasa alcalina y ácida. Las tinciones no enzimáticas incluyen Sudán negro B para lípidos, ácido periódico-Schiff (PAS) para glucógeno y azul de toluidina O para mucopolisacáridos.

3) Inmunofenotipificación. Un proceso de identificación de células basado en los tipos de marcadores (antígenos) de la superficie celular.

3.1) Subtipos de linaje linfocítico B Estos casos se identifican al encontrar marcadores de superficie celular en los blastos leucémicos que son idénticos a los que se desarrollan en linfocitos B normales. Casi el 85 por ciento de los casos son del subtipo precursor de células B.

3.2) Subtipos de linaje linfocítico T y citolítico natural. Estos casos se identifican al encontrar marcadores de superficie celular en los blastos leucémicos que son idénticos a los que se desarrollan en linfocitos T normales. Alrededor del 15 % de los casos son de los subtipos de células T y células NK ⁽⁸⁾.

Estas pruebas son importantes para determinar el subtipo de LLA del paciente. Algunas de las pruebas quizá se repitan durante y después de la terapia, para medir los efectos del tratamiento ⁽⁸⁾.

2.3.4 Tratamiento

Existen diferentes tipos de tratamiento para niños con LLA, los cuales deben ser supervisados por un oncólogo pediatra. La radioterapia y la quimioterapia son los dos tipos de tratamiento estándar para combatir la leucemia. Entre el 35 y 40% de los casos el tratamiento dura en promedio 2.5 años ⁽¹⁶⁾. La radioterapia es un tratamiento del cáncer que utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para eliminar células cancerosas. ⁽¹⁶⁾.

Sin embargo la quimioterapia es el tratamiento mas utilizado, en la cual se emplea medicamentos para interrumpir la proliferación de células cancerosas, mediante la destrucción de las células o evitando su multiplicación ⁽¹⁶⁾. Desafortunadamente no solo células malignas, sino que también ataca células normales como las del sistema digestivo (provocando diarreas y úlceras en la boca), las de la raíz del cabello (caída del mismo) y de la médula ósea (disminución de las células sanguíneas)⁽¹⁶⁾. Este tratamiento consiste en la administración de varios medicamentos por vías: intravenosa, oral e intratecal (por la columna vertebral). Dichos medicamentos se emplean con el objetivo de destruir las células leucémicas.

Las fases del tratamiento son:

- 1) **Inducción a la remisión:** Fase cuya duración es de cuatro a cinco semanas, se intenta destruir la mayor cantidad de células malignas.⁽⁵²⁾
- 2) **Consolidación:** El propósito de la terapia de consolidación e intensificación es destruir las células leucémicas restantes que tal vez no estén activas pero que pueden comenzar a regenerarse y producir una recaída.⁽⁵²⁾
- 3) **Erradicación de células leucémicas alojadas en la aracnoides (Profilaxis al SNC):** se administra generalmente durante cada fase de la terapia. Debido a que la quimioterapia que se administra oralmente

o se inyecta en una vena puede no llegar a las células leucémicas en el SNC (cerebro y espina dorsal), las células pueden encontrar un “santuario” (se esconden) en el SNC. La quimioterapia intratecal y la radioterapia pueden llegar a las células leucémicas del SNC y se administran para destruir las células leucémicas y evitar que el cáncer recidive (vuelva). La terapia santuario del SNC también se llama profilaxis del SNC.⁽⁵²⁾

- 4) Mantenimiento:** Su propósito es destruir toda célula leucémica restante que pudiera regenerarse y producir una recaída. A menudo, los tratamientos de cáncer suelen administrarse en dosis más bajas que aquellas para la inducción y la terapia de consolidación e intensificación. Esta fase también se llama terapia de continuación.⁽⁵²⁾

2.3.5 Grupos de riesgo

Los niños con leucemia linfocítica aguda se clasifican en dos grupos de riesgo:

- Alto riesgo.
- Bajo riesgo.

La parte más importante de las pruebas de laboratorio para las leucemias se centra en determinar el tipo de leucemia y los factores pronósticos⁽⁵⁰⁾.

2.3.6 Factores pronósticos

Se agrupan en las siguientes categorías:

- Indicadores clínicos y de laboratorio al momento del diagnóstico.
- Respuesta inicial al tratamiento.

Entre los indicadores clínicos y de laboratorio al momento del diagnóstico relacionados con los resultados, tenemos los siguientes:

- **Edad.** Los niños menores de un año y los niños mayores de 10 años se consideran pacientes de alto riesgo, por lo tanto se emplea un tratamiento más agresivo con el fin de mejorar los resultados. Los niños de 1 a 9 años tienen un resultado más favorable.⁽⁵⁰⁾
- **Sexo.** Las niñas tienen mayores probabilidades de curarse que los niños; esto se debe en parte a los episodios de recaídas testiculares y además los niños tienen mayor riesgo de recaídas en la médula ósea debido a factores que no se comprenden en su totalidad.⁽⁵⁰⁾
- **Raza.** Los niños de raza negra y los niños hispanos con leucemia linfocítica aguda tienen una tasa de cura más baja que los niños de otras razas, se desconocen las razones, pero no pueden ser explicadas en base a factores pronósticos conocidos.⁽⁵⁰⁾
- **Nivel de glóbulos blancos.** Los pacientes con conteo alto, se clasifican como de alto riesgo y generalmente necesitan tratamiento más intensivo. Generalmente se utiliza un conteo de 50,000 células por mm³ como umbral operacional entre un mejor o peor pronóstico: a pesar de que la relación entre un conteo de glóbulos blancos elevado está relacionado a otros factores pronósticos de alto riesgo como desplazamientos cromosómicos.⁽⁵⁰⁾
- **Morfología celular.** Para el estudio morfológico se toman en cuenta los criterios de la morfología Franco-Americo-Británica (FAB) que clasifica a la LLA como L1, L2 y L3 en base a las características morfológicas de la célula leucémica, entre el 70 y 85 % de los pacientes pediátricos cursan con LLA L1.⁽⁵⁰⁾

- **Inmunofenotipo de las células leucémicas.** Se basa en identificar la línea de linfocitos afectada, esto es los linfocitos T ó B. Es el criterio más importante, junto a la caracterización de las anormalidades cromosómicas en predecir la respuesta al tratamiento. Los niños con leucemia aguda de células pre B o Pre B tempranas reaccionan mejor que los que tienen leucemia de células T o de células B maduras.⁽⁵⁰⁾

- **Citogenética:** Es más probable que los pacientes se curen si sus células leucémicas tienen un mayor número de cromosomas (*hiperdiploides*), especialmente si hay un cromosoma 4,10, 17 y 18 adicional. Los niños cuyas células leucémicas tienen menos cromosomas (*hipodiploides*) tienen menos probabilidades de curarse. Los niños con una translocación entre los cromosomas 12 y 21 también tienen mayores probabilidades de curarse. Los niños con una translocación entre los cromosomas 9 y 22, o entre el 1 y el 19, tienen una tasa de cura más baja. Los niños con una translocación que afecte a los cromosomas 4 y 11 o todas las translocaciones q23 también tienen una tasa de cura menor.⁽⁵⁰⁾

- **El cromosoma Filadelfia.** t(9;22) está presente aproximadamente en el 4% de los LLA pediátrico y confiere un pronóstico desfavorable, sobre todo cuando se relaciona ya sea con un conteo alto de glóbulos blancos o una respuesta inicial lenta al comenzar la terapia. El LLA positivo al cromosoma Filadelfia es más común entre los pacientes mayores con LLA de precursor B y un conteo alto de glóbulos blancos.⁽⁵⁰⁾

2.3.7 LLA resistente al tratamiento y recaída.

La mayoría de los niños con LLA se cura, sin embargo un porcentaje importante (25-30%) desarrollan resistencia al tratamiento. Algunos niños tienen células residuales de leucemia en su médula ósea incluso después de un tratamiento intensivo. Esta circunstancia se denomina “leucemia resistente al tratamiento”. Algunos pacientes cuya leucemia entró en remisión después de la terapia padecen la reaparición de células de leucemia en la médula ósea y una disminución de la cantidad de células sanguíneas normales. A esta situación se denomina “recaída”⁽⁸⁾.

En el caso de la leucemia resistente al tratamiento, los enfoques empleados en el esfuerzo por inducir una remisión pueden incluir fármacos no utilizados en el primer ciclo de tratamiento, o un trasplante de médula ósea. En pacientes que recaigan, la duración de la remisión, la edad del paciente y los resultados citogenéticos en las células de leucemia influyen en el enfoque de la terapia ⁽⁸⁾.

2.3.8 Resistencia a fármacos en LLA

La mejora en el tratamiento de las malignidades hematológicas es uno de los mejores éxitos en la quimioterapia. Sin embargo, muchos pacientes desarrollan enfermedad recurrente después de respuestas terapéuticas iniciales, y muchos de ellos no responden a la quimioterapia en la recaída, debido al desarrollo de la resistencia a las drogas ⁽¹⁶⁾.

Se han identificado diferentes tipos de resistencia a agentes citotóxicos, la participación de transportadores de membrana juega un papel importante dentro de estos mecanismos de resistencia ⁽¹⁷⁾.

Uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a las drogas quimioterapéuticas es la presencia de Gp-170 resultante de la expresión del gen *mdr-1* en las células leucémicas. La actividad de la bomba dependiente de

energía de la Gp-170 permite la eliminación de drogas relacionadas y no relacionadas con la quimioterapia, causando resistencia al tratamiento. La exposición a drogas quimioterapéuticas induce la sobreexpresión de la Gp-170 en células blásticas ⁽¹⁸⁾. Se ha observado que las células leucémicas CD34+ que coexpresan *mdr-1* tienen un aumento de la actividad funcional de la Gp-170, y esto les confiere una mayor resistencia a drogas, correlacionando con una menor respuesta al tratamiento quimioterapéutico y presencia de niveles elevados de enfermedad mínima residual ⁽¹⁸⁾.

Existen otros transportadores que con menor frecuencia pueden estar involucrados en la resistencia múltiple a fármacos antineoplásicos, uno de los principales es la proteína asociada con multirresistencia a fármacos MRP ⁽¹⁸⁾.

2.4 Gen *mdr1*

Como ya se menciona, la Gp-170 es uno de los transportadores de membrana que inducen quimioresistencia más estudiado en la actualidad, es codificada por el gen *mdr1* (multidrug resistance 1), esta proteína es expresada de manera constitutiva en tejido normal y su función fisiológica es la de una bomba de expulsión dependiente de ATP ⁽¹⁹⁾. Algunos de los tratamientos más utilizados en las leucemias incluyen, antraciclina, vinca alcaloides, y podofilinas, las cuales son sustratos para la Gp-170. La sobre-expresión de esta proteína, induce excesivo flujo y por tanto una concentración intracelular insuficiente de estos agentes aun en las máximas dosis, lo que deriva en resistencia a diversas drogas quimioterapéuticas ⁽²⁰⁾.

Uno de los mecanismos que desarrollan las células leucémicas es la presencia del fenotipo MDR ⁽²¹⁾. Se considera que el fenotipo MDR1 generalmente se adquiere después de la administración de agentes quimioterapéuticos y es más prevalente en LLA y en carcinomas agresivos (por ejemplo, colon y ovario). Este fenotipo es asociado con la inducción del gen *mdr1*, que como ya se comentó codifica para la Gp-170 miembro de la familia de los ABC transportadores y su función es la de una bomba transportadora de

membrana dependiente de energía, la cual transporta una gran variedad de estructuras relacionadas con xenobióticos para mantener concentraciones subtóxicas en el citoplasma ⁽²²⁾. MDR1 es expresado en algunos tipos de células normales (por ejemplo, células del epitelio intestinal y linfocitos), pero su sobreexpresión correlaciona con resistencia a diferentes drogas ⁽²³⁾. Por otro lado, diversos estudios muestran que los mecanismos de transcripción involucrados en la inducción de Gp-170 en células tumorales humanas es muy complejo ⁽²³⁾.

Por ejemplo, se sabe que el promotor de *mdr1* presenta sitios de unión para diversos factores de transcripción dentro de los cuales se incluyen SP1, NF-Y, y YB-1 ⁽²⁴⁾. Recientes estudios demostraron que el factor inducible en hipoxia HIF-1 α (hipoxic inducible factor) regula de manera positiva el gen *mdr1* induciendo la expresión de la Gp-170, lo cual representa un mecanismo de resistencia a la quimioterapia de algunos tipos de tumores ⁽²⁵⁾.

2.5 Factores de Transcripción

Los factores de transcripción son uno de los grupos de proteínas que se unen al DNA y ayudan a iniciar un programa de aumento o disminución de la transcripción de genes. Como tales, son esenciales para muchos procesos celulares importantes. Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Los factores de transcripción interaccionan con regiones específicas del ADN, con elementos de la maquinaria de transcripción como la ARN polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad. Conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales ⁽²⁶⁾ ⁽²⁷⁾. Los factores de transcripción son esenciales para la regulación de la expresión génica y, en consecuencia se encuentran en todos los organismos vivos ⁽²⁸⁾.

2.5.1 Mecanismo de acción de los factores de transcripción

Los factores de transcripción se unen a cualquiera potenciador o regiones promotoras del DNA adyacente a los genes que regulan. Dependiendo del factor de transcripción, sea positiva o negativamente la transcripción de los genes adyacentes. Los factores de transcripción utilizan una variedad de mecanismos para la regulación de la expresión génica ⁽²⁹⁾.

Estos mecanismos incluyen:

- Estabilizar o bloquear la unión de la RNA polimerasa al DNA.
- Catalizan la acetilación o desacetilación de proteínas histonas. El factor de transcripción puede hacerlo directamente o con otras proteínas con esta actividad catalítica.
- Actividad Acetiltransferasa de histonas (HAT): acetila proteínas histonas, que debilita a la asociación de DNA con las histonas, que hacen que el DNA sea más accesible a la transcripción y, por tanto regular al alza la transcripción
- Actividad Histona deacetilasa (HDAC): deacetila proteínas histonas, lo que refuerza la asociación de DNA con las histonas, que hacen al DNA menos accesible para la transcripción y lo regula negativamente.

A continuación se presentan algunas de las importantes funciones biológicas y funciones de los factores de transcripción están implicados en:

- **Regulación de la transcripción basal:** En los eucariotas, una clase importante de factores de transcripción, llamadas factores de transcripción generales (GTFs) son necesarios para que se lleve a cabo la transcripción ^{(32) (33)(34)}. Muchos de estos GTFs en realidad no se unen al

ADN, pero son parte de la transcripción formando diversos complejos que interactúan con la RNA polimerasa directamente. El GTFs más comunes son TFIIA, TFIIB, TFIID.

- **Aumento diferencial de la transcripción:** Regulan la expresión diferencial de genes mediante la unión a varias regiones potenciador de DNA adyacentes a los genes regulados. Estos factores de transcripción son esenciales para asegurarse de que los genes se expresan en el lugar correcto en el momento adecuado y en la cantidad correcta en función de las necesidades cambiantes del organismo

- **Desarrollo:** Muchos factores de transcripción en los organismos multicelulares están involucrados en el desarrollo ⁽³⁵⁾. En respuesta a las señales (estímulos), estos factores de transcripción activan / desactivan la transcripción de los genes apropiados, que, a su vez, permite cambios en la morfología celular o actividades necesarias para determinar el destino celular y la diferenciación celular.

- **El control del ciclo celular:** Muchos factores de transcripción, especialmente los denominados oncogenes o supresores de tumores, ayudan a regular el ciclo celular y, como tal, determinar la magnitud de división celular ⁽³⁶⁾ ⁽³⁷⁾. Un ejemplo es el oncogén MYC que tiene un papel importante en el crecimiento celular y la apoptosis ⁽³⁸⁾.

2.5.2 El Factor de Transcripción Yin-Yang 1

Yin-Yang1 (YY1) es un factor de transcripción ubicuo que tiene un peso de 68-kDa, el gen de YY1 esta localizado en el cromosoma 14 en el segmento q32.2. Estructuralmente esta conformado por cuatro dedos de zinc de tipo C2H2, con dos dominios específicos que caracterizan su función como un activador o represor. El dominio de represión está dado por el dominio C-terminal. La región N-terminal actúa como un potente dominio activador. Esta región contiene un dominio rico en glicina y 11 residuos consecutivos de histidina. Así, la posición

C-terminal actúa como un represor de la transcripción y la posición N-terminal actúa como un potente dominio de activación. Lo que distingue esta proteína de otros factores de transcripción es su habilidad no solo de iniciar la transcripción sino que también la regula a través de activación o represión. Se sabe que YY1 tiene un papel importante en distintos procesos biológicos como la embriogénesis, la diferenciación, la replicación, y proliferación celular ⁽³⁹⁾.

Se estima que más de 7% de genes de vertebrados contienen sitios de unión para YY1, lo cual refleja la importancia de este factor de transcripción ⁽⁵²⁾.

Se ha sugerido que YY1 reprime la transcripción utilizando múltiples mecanismos. Frecuentemente estos mecanismos involucran la competencia de YY1 con factores de activación en los sitios de unión que se traslapan, por lo tanto, decrece la actividad del promotor y resulta una represión de transcripción. Otras hipótesis incluyen la regulación negativa de YY1 sobre los activadores unidos al promotor cercanos a él. En general, los modelos que explican a YY1 como un represor o activador de la transcripción son ⁽³⁹⁾:

Se ha observado que YY1 juega un papel muy importante en procesos apoptóticos, ya que este factor de transcripción es transportado rápidamente dentro del núcleo celular en respuesta a varios estímulos de apoptosis, los mecanismos involucrados son: subregulación de la actividad de p53, interferencia con poli-ADP-ribosa polimerasa, alteración en c-myc, expresión del factor nuclear kappa B (NF- κ B), entre otros. Lo anterior ha permitido concluir que YY1 además de participar en procesos biológicos normales, tiene un papel potencial para actuar como disparador de carcinogénesis. Existen varios estudios que apoyan lo antes mencionado, en donde se ha mostrado un aumento en la expresión y/o activación en diferentes neoplasias, como neoplasias hematopoyéticas, carcinomas, hepatocarcinoma y retinoblastoma. ^(40,41).

2.6. Apoptosis y YY1

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es la forma de muerte celular que se caracteriza por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos adyacentes, por lo que no provoca respuesta inflamatoria ⁽⁴⁰⁾. Es un mecanismo que permite la eliminación ordenada de células y, por tanto, participa en la morfogénesis, ontogenia y fisiología de las células, así como en la homeostasis de los aparatos y sistemas del organismo ⁽⁴²⁾.

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis (M), fase de control celular G1, síntesis de ADN (S) y fase de control G2. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis ⁽⁴²⁾.

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Se han descrito 11 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La cadena de degradación proteica tiene sucesivos clivajes dependientes de la ubicación del ácido aspártico que se repite en la estructura de la enzima. Se han descrito varios cientos de sustratos de caspasas. La activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en que participan varios complejos moleculares ⁽⁴³⁾. Las vías de apoptosis dependientes de caspasas más estudiadas son:

2.6.1 Vía extrínseca

La vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas, el factor de necrosis tumoral (TNF), y TRAIL (apoptosis-inducing ligand receptor)^(40,41,42).

La proteína transmembranal Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas 8 y 10. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores^(41, 42).

Algo similar sucede con los otros receptores de membrana TNFr y DR5 o DR4 (receptores de TRAIL). Su porción intracelular conecta con proteínas como TRADD y Raidd que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado TRAF activan proteínas-quinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario^{(40) (41) (42)}.

2.6.2 Vía intrínseca o mitocondrial

Otra vía de inducción de apoptosis es la denominada mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que

permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c y SMAC/DIABLO ^(19,20).

El citocromo c, una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa 9. Una vez que la caspasa 9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa 3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis ^(19,20).

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del citocromo c. Las proteínas tipo *BH3-only* activan a estas proteínas, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis ^(19,20).

Además de la salida de citocromo c desde la mitocondria, otra proteína llamada SMAC/DIABLO, que bloquea los inhibidores de caspasas (IAPS) sale de la misma. Así se tiene una vía en la que las caspasas efectoras están libres para actuar (dado que sus inhibidores fueron neutralizados por SMAC/DIABLO) ^(19,20).

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 ^(19, 20).

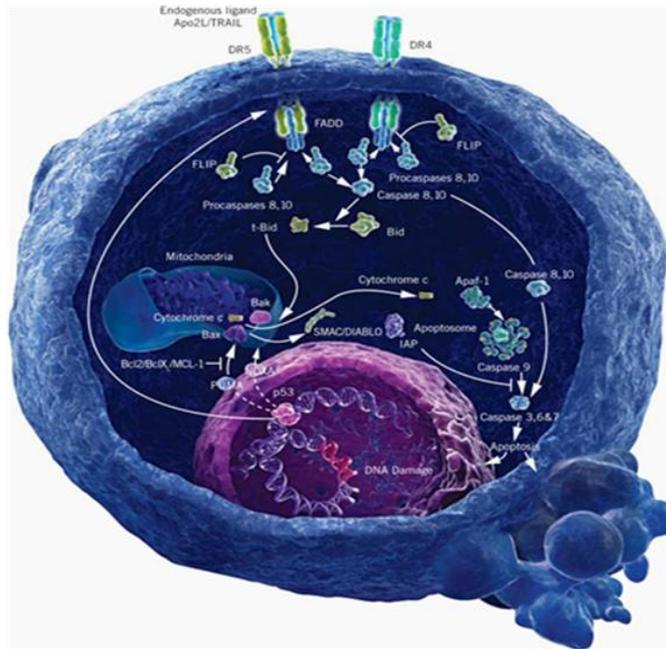


Figura 1. Ruta de señalización del proceso de Apoptosis celular.

Diferentes estudios han demostrado que YY1 reprime la transcripción del gen *Fas* ⁽⁴⁵⁾. El tratamiento de líneas celulares tumorales con un donador de óxido nítrico induce una sobre expresión de *Fas* y esta sobre expresión induce la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor ⁽⁴⁶⁾.

Otros trabajos realizados por nuestro grupo de trabajo demostraron en líneas celulares de cáncer de próstata y de ovario que YY1 regula también de forma negativa la expresión de DR5. Por otro lado, se demostró que líneas celulares de cáncer de próstata refractarias a tratamiento poseen mayor actividad de YY1 que las células epiteliales normales de próstata, hecho corroborado en un estudio de microarreglo de tejidos utilizando más de 250 pacientes con cáncer de próstata con diferente grado de malignidad ⁽⁴⁷⁾.

Dichos estudios sugieren que la sobre-activación de YY1 probablemente sea un mecanismo de resistencia a la apoptosis desarrollada por las células tumorales.

De acuerdo con las investigaciones que ha realizado nuestro grupo de trabajo en cáncer y YY1, estamos interesados en el estudio de la regulación de la resistencia a la quimioterapia en el LLA. Empleando el programa TESS (Transcription Element Search System) el cual conjuga las bases de datos de TRANSFAC v6.0, JASPAR 20060301, IMD v1.1 y CBI/GibbsMat v1, fueron analizados 2000 nucleótidos río arriba de la secuencia ATG (sitio de inicio de la transcripción) del promotor del gen *mdr1* para la predicción de factores de transcripción que se pueden unir a este promotor para su regulación transcripcional. Con este análisis se lograron identificar cuatro sitios de unión YY1 en el promotor del gen *mdr1* ubicados a -270, -1230, -1420 y -1860, los resultando obtenidos de este análisis sugieren que el gen *mdr1* pueda ser regulado de manera transcripcional por YY1. Por lo que resulta razonable pensar que la expresión de YY1 y Gp-170 estén jugando un papel importante en la LLA.

3. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y regímenes de tratamiento para la LLA entre el 25 y el 30% de los pacientes desarrollan resistencia a estos tratamientos y no sobreviven ⁽⁵¹⁾. Uno de los mayores obstáculos que no permiten que los tratamientos tengan éxito es que las células leucémicas desarrollan resistencia a los agentes antineoplásicos. Una vez que las células leucémicas se vuelven resistentes a los fármacos, las opciones de tratamiento son muy limitadas, porque el rango de resistencia aumenta, aun a agentes antineoplásicos a los que el paciente nunca fue expuesto ⁽⁴⁹⁾. Por lo tanto para poder mejorar los resultados clínicos en la leucemia es esencial desarrollar estrategias efectivas para revertir la resistencia, pero los complicados mecanismos involucrados en dicha resistencia a las drogas constituyen un problema mayor.

El factor de transcripción YY1 juega un papel fundamental en procesos biológicos como embriogénesis, diferenciación, proliferación celular y carcinogénesis. Recientes estudios realizados por nuestro grupo de trabajo en colaboración con la UCLA han demostrado que la sobre-activación de YY1 en células tumorales representa un mecanismo de resistencia a la apoptosis. La participación de YY1, en los mecanismos de resistencia a drogas es aún desconocida, aunque recientemente identificamos que el promotor del gen *mdr1* contiene 4 sitios específicos de unión para este factor de transcripción; lo que hace probable que YY1 actúe también como un regulador de este gen. Consecuentemente, resulta importante establecer si existe una asociación entre la expresión de YY1 y Gp-170 y si la expresión de estas proteínas influenciada la respuesta al tratamiento de pacientes con LLA.

4. HIPOTESIS

El factor de transcripción YY1 regula la expresión del gen *mdr1*, induciendo un aumento en la expresión de la proteína Gp-170. Este mecanismo participa en el detrimento o pérdida de la respuesta a la quimioterapia antitumoral en la población pediátrica con LLA.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la expresión del factor de transcripción YY1 y de la proteína Gp-170 en CMN de sangre periférica de pacientes pediátricos con LLA y si dicha expresión esta relacionada en las resistencia a la quimioterapia.

5.2 Específicos

- Determinar la expresión de YY1 y de la proteína Gp-170 en CMN en sangre periférica mediante la técnica de inmunocitoquímica.
- Determinar la correlación que existe entre la expresión de YY1 y la proteína Gp-170 con los parámetros de riesgo a presentar resistencia a la quimioterapia en LLA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Pacientes.

Se estudiaron muestras de sangre periférica de 28 pacientes pediátricos entre 1-18 años con una media de 5 años de edad, masculinos o femeninos, con diagnóstico de LLA que fueron hospitalizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, dichas muestras fueron proporcionadas por el servicio de Hemato-oncología de nuestro Hospital. Así como 18 controles sanos que no presentaban ningún tipo de patología hematológica que fueron proporcionados por el servicio de laboratorio clínico central de nuestro Hospital.

Una vez seleccionados los pacientes que reunieron los criterios de inclusión, aceptación o firma de carta de consentimiento informado, se les tomó la muestra para el desarrollo de nuestro estudio. Se realizó la purificación de células dentro de las dos primeras horas.

6.2 Criterios

6.2.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión de los pacientes considerados para este estudio son los siguientes:

- Edad de 0-18 años
- Pacientes femeninos y masculinos
- Con diagnóstico de LLA confirmado por estudios morfológicos, e inmunofenotipo.
- Pacientes de reciente diagnóstico sin tratamiento previo
- Todos los pacientes recibirán el mismo tratamiento de quimioterapia de acuerdo al riesgo en que se clasifiquen
- Consentimiento informado

6.2.2. Criterios de exclusión

- Se excluirán a los pacientes con síndromes de fragilidad cromosómica como síndrome de Bloom y ataxia telangiesctasia
- Muestra insuficiente

6.2.3 Criterios de eliminación

- Muerte
- Abandono del tratamiento antes de completar la fase de inducción.

6.3 Aislamiento de progenitores linfo-hematopoyéticos.

Las CMN de sangre periférica heparinizadas fueron obtenidas por centrifugación con Ficoll/Hypaque $\sigma=1.077$, después de hizo la cuenta viable por exclusión de azul tripán y se bloquearon los receptores Fc.

Las células que expresan CD34 fueron sujetas un proceso de selección positiva por columna magnética utilizando el kit de aislamiento directo de Miltenyi Biotec, y se tiñeron con FITC-anti-CD34, PE-anti-CD38, biotina-anti-marcadores de linaje, PE-Cy5-anti-CD7, y APC-anti-CD10, seguido de la tinción con estreptavidina-PE-Texas Red. Después de las correspondientes incubaciones y lavados, las fracciones de HSC/MPP (Lin⁻CD34⁺CD38⁻), progenitores linfoides de células B (Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁺), y progenitores linfoides de células T y NK (Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD7⁺) fueron purificadas por citometría de flujo en un sorteador Moflo Cytomation.

La LLA de precursores de células B es prevalente entre las leucemias agudas, representando alrededor del 80% de los casos, la gama de precursores comprometidos al linaje de B fue analizada en la enfermedad y purificada como: células B tempranas CD34⁺CD19⁻CD10⁺, pro-B CD34⁺CD19⁺CD10⁺, pre-BI grandes CD34⁺CD19⁺CD10⁺, pre-BII grandes CD34⁻CD19⁺CD10⁺, pre-BII

pequeñas CD34⁻CD19⁺CD10⁺, B inmaduras CD34⁻CD19⁺CD10⁺sIgM⁺ y B maduras CD34⁻CD19⁺CD10⁻sIgM⁺sIgD⁺.

6.4 Purificación de células de sangre periférica.

La purificación de CMN de sangre periférica se realizó mediante la técnica de separación por gradiente, por centrifugación; empleando Ficoll-PaqueTM PLUS (Ficoll-PaqueTM PLUS, GE Healthcare, sweden), se realizó una mezcla de Ficoll con la muestra de sangre problema guardando una relación v/v de 2:1.

La mezcla se llevo a cabo en un tubo de 15ml (Axygen® estéril vol.15ml) que contenía el volumen adecuado de Ficoll al cual se le adicionó lentamente por las paredes del tubo la muestra problema de sangre; posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 25min

Después se llevó a cabo la separación de la capa de células y se colocó en un tubo de 2.0mL (Eppendorff estéril vol.2ml) donde se adicionó solución amortiguadora de fosfatos 1x (Phosphate buffered Saline, PBS 1X pH 7.2) hasta cubrir el volumen total del tubo y se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 1500 rpm, esta operación se repitió 2 veces mas, finalmente se decantó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 1 mL de PBS 1X.

6.5 Preparación de laminillas.

Después de la purificación de células, se llevó a cabo el conteo de las mismas, preparando una nueva suspensión de células con una dilución 1:100 en PBS, posteriormente las CMN fueron teñidas con azul tripano y contadas en la cámara de Neubauer (Neubauer improved, Tiefe depth profunder 0.100mm, Marienfeld, Germany) bajo microscopia de luz (10 X), se realizó el cálculo para obtener la cantidad de células totales en un ml, con el valor obtenido se ajustó la cantidad de células a 10 000 células/ μ L. Este valor se multiplicó por el número de laminillas (Portaobjetos para microscopio esmerilados 25x75mm, Madesa®

México) que se podía preparar y se añadió el PBS 1X suficiente para su preparación (10×10^3 células en 100 μ l).

Después de dejar secar las laminillas a temperatura ambiente se rotularon y se fijaron las células con formaldehído al 4% por 20 minutos a 4°C. Posteriormente se llevo a cabo un lavado de PBS 1X por 5 minutos para retirar los residuos de formaldehído.

Finalmente se las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron para su posterior inmunotinción.

Anticuerpos

- IgG Normal Rabitt (Santa Cruz, Biotechnology).
- Anticuerpo policlonal Anti-MDR1 de humano hecho en conejo (Santa Cruz, Biotechnology).
- Anticuerpo policlonal Anti-YY1 de humano hecho en conejo (Santa Cruz, Biotechnology).

6.6. Inmunocitoquímica.

A partir de las laminillas con células preparadas se procedió a la realización de la inmunotinción. Brevemente, se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio (pH 6.0, 0.01M), por 20 minutos a 90 °C en baño María, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de citrato. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos, esta operación se llevo a cabo 2 veces. Se bloqueó la unión no específica de los anticuerpos a las células, incubando las muestras con en suero normal de cerdo al 2% durante 1hr temperatura ambiente en cámara húmeda

Posteriormente, se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos correspondientes (anti-MDR1 dilución 1:500 o anti YY1 dilución 1:750) en cámara húmeda.

Después de lavar con PBS 1X, las laminillas se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado a biotina por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar se adicionó estreptavidina conjugada a HRP (Universal LSAB+ KIT/HRP, DAKO Cytomation), por último el color se generó mediante la adición del substrato cromógeno denominado Diamino Benzidina (Diamino Benzidine, DAB) durante el tiempo requerido de cada marcador con respecto al control de isotipo; se detuvo la reacción con agua y se contratiñó con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron bajo las siguientes condiciones: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

6.7 Cuantificación de células positivas inmunoteñidas.

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campo para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD.USA). Se contaron 100 células en cada laminilla, para obtener el % de células positivas a la inmunteñición.

6.8 Transfección

Plásmidos.

NOMBRE	TAMAÑO	REFERENCIA
pGL3	4818 pb	Vector de clonación, Promega Corporation, USA.
CMV /pGL3	5418 pb	Este trabajo. Contiene la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV).

MDR1/pGL3	6818 pb	Este trabajo. Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> .
M(-3)	5748 pb	Este trabajo. Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> , con la delección de tres sitios de unión a YY1.

Los plásmidos utilizados fueron proporcionados por la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del hospital Infantil Federico Gómez.

Líneas celulares.

Línea celular	Características
PC3	Línea celular obtenida a partir de adenocarcinoma de próstata, grado IV. Con crecimiento adherente, con aplicación en ensayos de transfección.
COS 7	Línea celular obtenida a partir de fibroblastos de riñón de mono africano, apropiada para ensayos de transfección.

6.8.1 Transfección de líneas celulares PC3 y COS 7 con el DNA plasmídico.

El DNA plasmídico se introdujo en ambas líneas celulares utilizando el método de lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, un total de 2×10^5 células/pozo se crecieron en placas de 24 pozos (COSTAR, Corning Incorporated, USA) durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó una mezcla de 1 μ g de DNA con un 1 μ l de lipofectamina a cada pozo, se incubó durante cuatro horas. Se dejaron en cultivo las células durante toda la noche a 37°C y 5% de CO² y al siguiente día se hizo la cuantificación de Unidades Relativas de Luciferasa (URL) en un luminómetro marca Turner Biosystems con placa de 96 pozos, empleando 20 μ l de lisado de células y añadiendo 100 μ l de sustrato para luciferasa marca Promega.

6.9 Análisis Estadístico.

Se laboró una base de datos y la información se procesó utilizando un programa de análisis estadístico (Prisma 4® de GraphPad Software, Inc., San diego, CA). La evaluación de la diferencia en el número de células positivas de las reacciones de inmunocitoquímicas se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA). Para los análisis de correlación se realizó utilizando una prueba de Pearson. Un valor <0.05 fue considerado como significativo.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis Clínico

Se revisaron los expedientes de 16 niños con diagnóstico de LLA de acuerdo a los criterios de inclusión de nuestro proyecto, posteriormente se le realizó la toma de muestra de sangre periférica. En la distribución por género 6 pacientes fueron del sexo masculino (54%) y femenino (46%), la edad promedio fue de 5 años y el rango de 1-18 años. Ejemplo de las características clínicas se presentan en la Tabla 1. El 25% de los pacientes presentó características de riesgo estándar o habitual, lo que significa que en los parámetros de evaluación no presentaron complicaciones de respuesta a la quimioterapia. El 75% restante presentaron características de alto riesgo lo que nos indica que dentro de los parámetros de evaluación presentan diversos factores que predisponen al paciente a presentar quimioresistencia.

7.2 Evaluación de la expresión de YY1 y Gp-170.

Los resultados del análisis de la expresión de YY1 y la Gp-170 se muestran en la **Fig.1**, se encontró tanto la expresión de YY1 (**Fig.1c**) como la de Gp-170 (**Fig.1e**) se observa aumentada en las CMN de los pacientes con LLA, en comparación con los controles sanos(**Fig.1b,1d**), en los se muestran menor expresión tanto de YY1 como Gp-170. YY1 se expresó principalmente a nivel nuclear, y Gp-170 a nivel citoplasmático. Como control de especificidad de la tinción inmunoglobulinas normales de conejo (control IgG) (**Fig1a**).

En la **Fig.2** mostramos la gráfica en donde se incluye el porcentaje de células positivas tanto de YY1 como de Gp-170, tanto en los pacientes como en el grupo control, se incluyeron los 30 pacientes analizados. Se puede observar que existe un aumento en la expresión de ambas proteínas el cual estadísticamente es significativo en los pacientes con LLA.

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre la expresión de YY1 y Gp-170 en nuestro grupo de pacientes con LLA utilizando una prueba de

Pearson. Los resultados nos muestran que existe una correlación directamente proporcional ($r=0.935$, $p=0.0001$) entre la expresión de YY1 y Gp-170 (**Fig.3.**)

Los resultados anteriores demuestran que existe un aumento en la expresión de YY1 y Gp-170 en pacientes con LLA comparado con controles sanos, y además esta expresión es directamente proporcional.

7.3 Evaluación de la expresión de YY1 y de Gp-170 en los diversos estadios de diferenciación linfoide.

Hasta el momento no se ha descrito la expresión de YY1 y Gp-170 en los diversos estadios de diferenciación linfoide. A partir de los diferentes precursores linfocitarios para células B purificados por citometría de flujo como se describe en materiales y métodos, se llevo a acabo la evaluación de la expresión de YY1 y Gp-170 mediante inmunocitoquímica. La **Fig.4** a muestra las microfotografías representativas de ambas proteínas en los diferentes estadios de diferenciación, donde se observa una expresión diferencial. Que incluye la expresión diferencial de células B, Pre-pro (**Fig.4 b, c**) células Pro-B (**Fig.4 e, f**), células Pre-B (**Fig.4 h, i**), células B (**Fig.4 k, l**). La expresión de YY1 fue primordialmente nuclear, mientras que la expresión de Gp-170 fue principalmente en la membrana y en citoplasma, como control de especificidad de la tinción inmunoglobulinas normales de conejo (control IgG).(**Fig.4 a, d, g, j**).

La **Fig.5** muestra la gráfica con el porcentaje de células positivas en 7 diferentes pacientes donde se purificaron los precursores de CMN de sangre periférica de LLA de pacientes y de 2 controles sanos. Se puede observar que algunos pacientes muestran una elevada expresión de ambas proteínas desde etapas muy tempranas de diferenciación como con los casos de los pacientes 1, 3 y 12. Mientras que otros pacientes solo expresan estas proteínas en estadios tardíos (pacientes 2,5 y 6). En el caso de los controles solo se observo expresión en células B maduras, lo cual era lo esperado en sangre periférica.

Los resultados anteriores demuestran que la expresión de YY1 y Gp-170 se puede observar en etapas muy tempranas de diferenciación de células B en pacientes de LLA.

7.4 Asociación de la expresión de YY1 y Gp-170 en LLA de alto riesgo

La siguiente pregunta a contestar en este trabajo, fue como la expresión de YY1 y Gp-170 podían asociarse con los datos clínicos del grupo de pacientes de LLA utilizados. Los médicos oncólogos utilizan criterios clínicos y paraclínicos para clasificar a los pacientes con LLA de riesgo habitual o riesgo alto lo cual significa si son buenos o malos respondedores a la quimioterapia, estos parámetros se muestran en la Tabla 1.

En la **Fig.6** se muestra la gráfica de los porcentaje de células positivas tanto de YY1 como de Gp-170 en el grupo de LLA, en donde se correlaciona con el grado de riesgo de acuerdo a la tabla 1 que presentan los pacientes ($p= 0.02$) . Se puede observar que existe un aumento estadísticamente significativo de ambas proteínas en los pacientes con LLA de alto riesgo

La **Fig.7** muestra una microfotografía representativa de la expresión de YY1 y Gp-170 en un paciente de alto riesgo en el cual antes y después del tratamiento (**Fig.7 b, d**) con quimioterapia se puede observar un aumento claro de la expresión de ambas proteínas en el caso de las muestras post-tratamiento si se compara con la muestra pre-tratamiento (**Fig.7 a, c**).

Los resultados anteriores nos muestran que los factores que determinan el grado de riesgo que tiene un paciente de LLA se asocian con la expresión de YY1 y Gp-170. Lo que sugiere que YY1 puede estar regulando la expresión de Gp-170 y esto pueda determinar la respuesta al tratamiento.

7.5 Evaluación de la participación de YY1 en la regulación transcripcional del gen que codifica para Gp-170.

Para poder evaluar si YY1 puede regular de manera transcripcional el gen *mdr1* el cual codifica para Gp-170, en nuestro grupo de trabajo se construyo mediante técnicas de biología molecular un plásmido reportero que contenía el promotor del gen de *mdr1* (plásmido MDR1/pGL3), y otro plásmido que contenía la secuencia promotora de *mdr1* (plásmido M(-3)) en el cual fueron deletados tres sitios de unión para YY1.

Con estos plásmidos se llevo a cabo la transfección de la línea celular PC3 y la línea celular COS 7. La transfección se realizo como se describe en materiales y métodos. En la figura 8a muestra la gráfica se puede observar que en la línea celular PC3, la lectura obtenida para el promotor de *mdr1* (MDR1/pGL3) es de aproximadamente 550 URL mientras que el promotor de *mdr1* (M(-3)) menos tres sitios de unión YY1 presenta un valor de 180 URL, presentando diferencia estadísticamente significativa. En la figura 8b, correspondiente a la línea celular COS 7, también se presenta diferencia significativa entre el promotor de *mdr1* (MDR1/pGL3) con 550 URL y el promotor de *mdr1* menos tres sitios de unión YY1 (M(-3) con una lectura de 350 URL.

Los resultados anteriores demuestran que los sitios YY1 que fueron deletados son requeridos para un óptimo funcionamiento del promotor *mdr1* lo cual indica que YY1 esta regulando de manera transcripcional al gen *mdr1* y por lo tanto muy probablemente la expresión de Gp-170.

8. DISCUSION

La LLA infantil es un problema de salud muy importante en México y el mundo, pues se estima que cada año se diagnostican 15 casos de cáncer infantil por cada 100.000 niños menores de 15 años. La mitad de estos, aproximadamente, se originarán en menores de 4 años. A pesar de los importantes avances en el tratamiento del cáncer permanece como la segunda causa de muerte en niños en los países industrializados y en países en desarrollo siete de cada 10 muertes infantiles, por lo que, en las últimas 3 décadas se ha observado una disminución dramática en la tasa de mortalidad por cáncer en niños. La supervivencia global a los cinco años del diagnóstico ha pasado del 56% en el período entre 1983-1985 a un 70% en el período 1992-1994; una mejoría global de 16% en tan sólo siete años de desarrollo de los tratamientos ⁽⁴⁾. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez actualmente se ha reportado una sobrevida alrededor del 80%. Sin embargo a pesar de los esfuerzos en el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos un 20% de los casos de LLA desarrollan resistencia a la quimioterapia ⁽⁵⁰⁾.

En la resistencia a la quimioterapia intervienen diversos mecanismos uno de los más estudiados es el de MDR1, cuando las células se encuentran en condiciones normales este fenotipo consiste en un mecanismo de eflujo a los agentes citotóxicos, desde el interior celular hacia el exterior mediada de una bomba de expulsión dependiente de ATP. El gen *mdr1* codifica para la proteína Gp-170 la cual constituye la acción de bomba expulsora que ya se mencionó ⁽⁴⁸⁾.

Se sabe que cuando existe sobre-expresión de Gp-170 se presenta resistencia cruzada a diferentes drogas que no presentan ni homología estructural ni en su mecanismo de acción ⁽⁴⁸⁾. Se sabe que la regulación del gen *mdr1* es muy complejo y no está completamente elucidado.

Por otro lado nuestro grupo de trabajo tiene una amplia experiencia en el estudio del factor de transcripción YY1 que se caracterizan por su función como un activador o represor, también se sabe que YY1 está implicado en mecanismos de resistencia a apoptosis, regulando la expresión de FAS y DR5

(receptores de muerte). Diversos estudios demuestran que YY1 puede estar implicado en la patogénesis de diferentes tipos de cáncer como próstata y ovario, entre otros ^(45, 46, 47).

En este trabajo estudiamos la importancia de YY1 en la regulación de Gp-170 esto debido a que estudios previos en nuestro grupo de trabajo demostraron mediante una prueba de TESS (Transcription Element Search System) que el gen *mdr1* contiene cuatro sitios unión para YY1 ubicados a -270, -1230, -1420 y -1860. Por lo que es razonable pensar que el gen *mdr1* pueda ser regulado de manera transcripcional por YY1. Y esta regulación puede afectar la expresión de Gp-170 y por lo tanto el resultado del tratamiento quimioterapéutico con pacientes de LLA..

Existen pocos estudios de la expresión de Gp-170 y no existen reportes a la fecha de la expresión de YY1 en células de pacientes con LLA. Por lo que el presente estudio representa el primer reporte de la expresión de YY1 en este tipo de pacientes así como la correlación de la expresión de YY1 y Gp-170 con la respuesta a l tratamiento de quimioterapia.

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la expresión del factor de transcripción YY1 y de la proteína Gp-170 en CMN de sangre periférica de pacientes pediátricos con LLA y si dicha expresión esta involucrada en la resistencia a la quimioterapia para esto se hizo uso de diferentes técnicas metodológicas y estadísticas. La expresión de estas proteínas se pudieron analizar utilizando métodos inmunocitoquímico y la purificación de CMN progenitoras hematopoyéticas por medio de citometría de flujo.

Las pruebas de inmunocitoquímica se llevaron a cabo con laminillas preparadas a partir de CMN de sangre periférica de pacientes de LLA así como con laminillas de controles sanos, como se observa en la Fig.1, donde se puede aprecia un aumento de la expresión de YY1 a si como de Gp-170 Cuando evaluamos de manera cuantitativa la expresión de estas proteínas se observa que existe una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas (Fig.2), adicionalmente se llevo a cabo un análisis de correlación entre el

porcentaje de células positivas YY1 y Gp-170 la Fig.3, nos muestra que existe una correlación directamente proporcional entre la expresión de YY1 y Gp-170 ($r=0.935$, $p=0.0001$).

Por otro lado, se evaluó la expresión de YY1 y Gp-170 en CMN de médula ósea en los diferentes precursores linfocitarios de pacientes con LLA, primero se llevo a cabo la separación y purificación de estos precursores por medio de citometría de flujo. Como ya mencionamos la LLA de células B representa la leucemia mas. Por lo que se llevo a cabo la evaluación de la expresión de YY1 y Gp-170 mediante inmunocitoquímica, en la Fig.4 se observa la expresión de ambas proteínas en los diferentes estadios de diferenciación celular que incluye la expresión diferencial de células B, Pre-pro (Fig.4 b, c) células Pro-B (Fig.4 e, f), células Pre-B (Fig.4 h, i), células B (Fig.4 k, l) que muestra una expresión diferencial. La importancia de encontrar la expresión tanto de YY1 como de Gp-170 en estadios celulares tempranos es que no existen estudios a la fecha muestren en que momento de la diferenciación linfoide existe la modificación, que resulta en la modificación de la expresión de Gp-170 y por tanto pueda modificar la respuesta al tratamiento. En la Fig.5 se muestra la gráfica con el porcentaje de células positivas en 7 diferentes pacientes donde se purificaron los precursores celulares de pacientes de LLA y de 2 controles sanos, y se observa una elevada expresión de ambas proteínas desde etapas muy tempranas de diferenciación linfopoyética en LLA.

Por otro lado se llevo a cabo la asociación de los parámetros clínicos que determinan el grado de riesgo de los pacientes de LLA con el porcentaje de expresión de YY1 y Gp-170 (Fig.6) donde se evidencia de manera muy clara que si un paciente de LLA es de alto riesgo existe un aumento de la expresión de ambas proteínas, lo cual nos sugiere que los pacientes que se consideren de alto riesgo tendrán mayor expresión tanto de YY1 como de Gp-170 y posiblemente esto les confiera mayor resistencia al tratamiento quimioterapéutico.

Esto fue corroborado mediante el análisis inmunocitoquímico en CMN de sangre periférica en un pacientes con LLA que se consideraran de alto riesgo,

como se puede observar en la Fig.7 antes de comenzar el tratamiento quimioterapéutico se presenta menos expresión de ambas proteínas, y después del tratamiento hay una sobre expresión tanto de YY1 como de Gp-170. Lo cual resulta muy importante porque sugiere que la expresión de estas proteínas se ve aumentados después del tratamiento y puede determina su éxito.

Por último se para poder evaluar si YY1 puede regular de manera transcripcional el gen *mdr1* el cual codifica para Gp-170, nuestro grupo de trabajo, mediante el uso de técnicas de biología molecular se construyo un plásmido reportero que contenía el promotor del gen de *mdr1* (plásmido MDR1/pGL3), y otro plásmido que contenía la secuencia promotora de *mdr1* (plásmido M(-3)) con los cuales tres sitios de unión para YY1 fueron deletados.

Con estos plásmidos se llevo a cabo la transfección de la línea celular PC3 y la línea celular COS 7. En la Fig. 8a muestra la gráfica en donde se observar que en la línea celular PC3, la lectura obtenida para el promotor de *mdr1* (MDR1/pGL3) se ve aumentada comparada con el promotor de *mdr1* (M(-3)) menos tres sitios de unión YY1 que presenta un valor mucho menor, presentando así una diferencia estadísticamente significativa. En la Fig. 8b, correspondiente a la línea celular COS 7, también se presenta un aumento significativo entre el promotor de *mdr1* (MDR1/pGL3) y el promotor de *mdr1* menos tres sitios de unión YY1 (M(-3)) con una lectura menor.

Los resultados anteriores demuestran que los sitios YY1 que fueron deletados son requeridos para un óptimo funcionamiento del promotor *mdr1* lo cual indica que YY1 esta regulando de manera transcripcional al gen *mdr1* y por lo tanto muy probablemente la expresión de Gp-170.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo mostramos que existe un incremento significativo en la expresión de YY1 y Gp-170 en CMN de sangre periférica de pacientes pediátricos de LLA. Así como la presencia de una correlación directamente proporcional ($r = 0.935$, $p = 0.0001$) entre la expresión de YY1 y Gp-170 en LLA.

Por otro lado demostramos que la participación de los parámetros clínicos de clasificación del grado de riesgo de los pacientes con LLA son factores importantes que se relacionan con la sobre expresión de YY1 y Gp-170, ya que se observó que si un paciente de LLA es de alto riesgo, éste expresa en mayor cantidad YY1 y Gp-170.

Por primera vez se presenta y demuestra la expresión de YY1 y Gp-170 en los diversos estadios de diferenciación linfocítica de células B. tanto en fases tempranas como tardías y esto relacionado con los parámetros de evaluación clínicos del grado de riesgo nos puede sugerir el comportamiento de respuesta al tratamiento quimioterapéutico.

También se muestra como en los casos de LLA de alto riesgo pre tratamiento quimioterapéutico hay menos expresión tanto de YY1 como de Gp-170 en comparación con la expresión de ambas proteínas post-tratamiento, lo que nos sugiere que en los casos de alto riesgo hay una mayor probabilidad de presentar quimioresistencia.

10. ANEXOS

10.1 Características Clínicas y Parámetros que determinan el grado de riesgo de LLA durante la infancia.

	Edad	Sexo	Conteo de células celulas / μ L	LCR	Precursores de Células B	Células T	Cromosoma Philadelphia	Ventana inicial de tratamiento con dexametasona	Presencia de Blastos en inducción a la remisión
Riesgo Estándar									
#1	3.7	Femenino	6500	Neg	√		Neg	√	√
#2	7	Femenino	8500	Neg	√		Neg	√	√
Media	5.3	Femenino	7500						
Desviación Estándar	2.3		1414						
Alto riesgo									
#3	3.11	Femenino	20000	neg	¿	¿	Neg	√	√
#4	3.2	Masculino	16000	neg	¿	¿	Neg	√	√
#5	3.11	Masculino	700	neg	¿	¿	Pos	√	√
#6	14	Femenino	391000	neg	√		Neg	√	√
#7	11	Femenino	1700	neg		√	Neg	√	√
#8	2.8	Masculino	245000	pos		√	Pos	√	√
#9	6.2	Masculino	5700	pos		√	Neg	√	√
#10	10	Masculino	13800	neg	√		Neg	Resistencia	√
Media	6.6		86738						
Desviación Estándar	4.41		148132						

Tabla 1. Características clínicas del grupo de estudio de LLA con riesgo habitual o estándar y de alto de riesgo. 49

10.2. Incremento de la Expresión de YY1 y Gp-170 en Pacientes con LLA

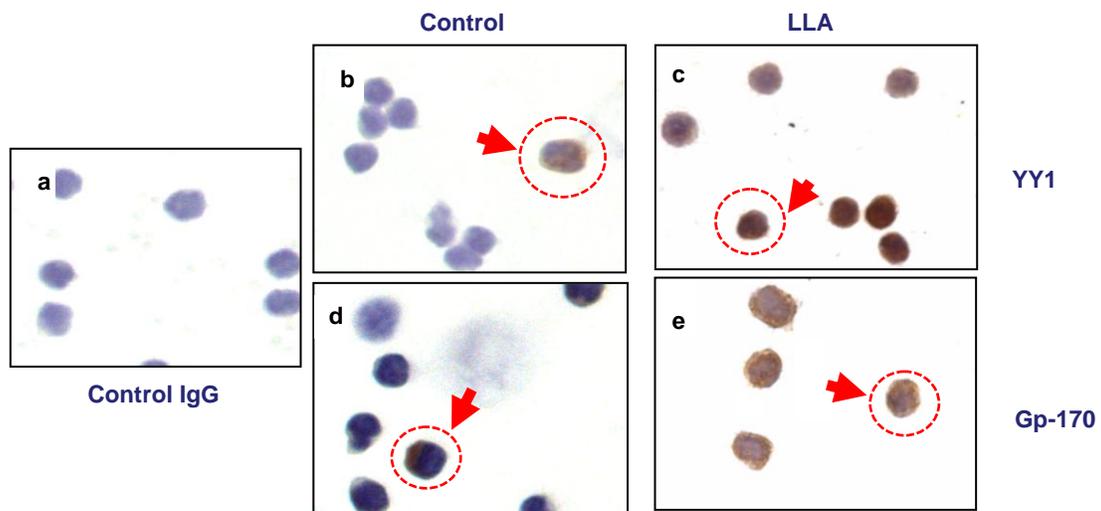


Figura 1. Microfotografía representativa del Incremento de la expresión de las células positivas de YY1 y Gp-170. Los controles sanos, muestran menor expresión de YY1 y Gp-170, (b, d). En las muestras de pacientes con LLA se muestra una mayor expresión de YY1 y Gp-170 en el citoplasma de las células para el caso de Gp-170 y en el núcleo en el Caso de YY1 (c, e). El control de isotipo no muestra tinción(a). Magnificación 100X.

10.3. Incremento de la expresión YY1 y de Gp-170 en pacientes con LLA

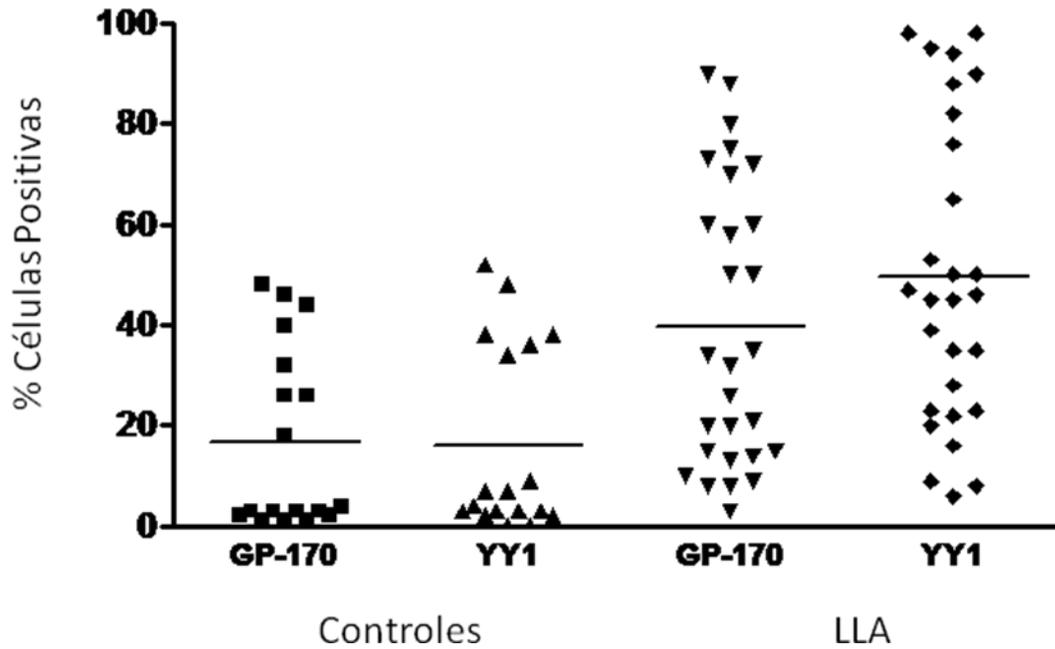


Figura 2. Porcentaje de células positivas en la expresión de YY1 y Gp-170 en LLA. Cada punto representa el porcentaje de expresión de YY1 y Gp-170 respectivamente en las células de sangre periférica de cada paciente. Se observa claramente un incremento en el porcentaje de células positivas de los pacientes del grupo de LLA en comparación con la expresión en los controles sanos. $p=0.0001$ ANOVA.

10.4. Correlación positiva entre YY1 y Gp-170

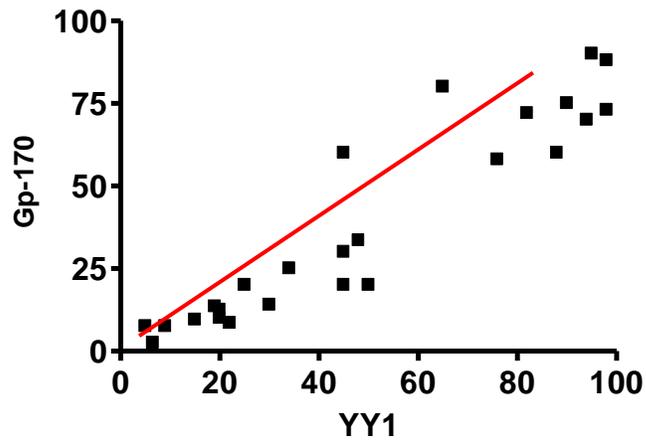


Figura 3. Análisis de correlación entre la expresión de YY1 y Gp-170 . El porcentaje de la expresión de Gp-170 en las células de los pacientes con LLA muestra una correlación directamente proporcional entre la expresión de YY1 y Gp-170 ($r=0.935$, $p=0.0001$). Resultados calculados con la prueba de Pearson.

10.5. Incremento de la expresión de YY1 y Gp-170 en células B precursoras de pacientes con LLA

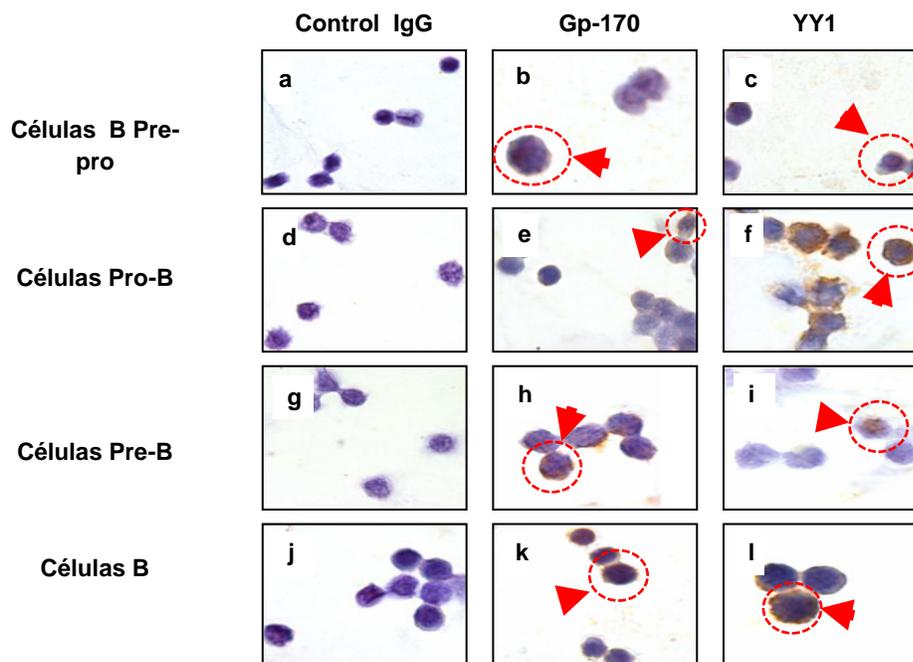


Figura 4. Microfotografías representativas de la expresión de YY1 y Gp-170 en células B precursoras de pacientes con LLA. Los controles de isotipo, se muestran negativos para la expresión de YY1 y Gp-170 en los diferentes estadios de diferenciación de células B (a, d, g, j). En las muestras de pacientes con LLA se muestra la expresión positiva de YY1 (c, f, i, l) y Gp-170 (b, e, h, k) respectivamente en los diferentes estadios celulares.

10.6 Incremento de la expresión de Gp-170 y YY1 en diferentes precursores de células B

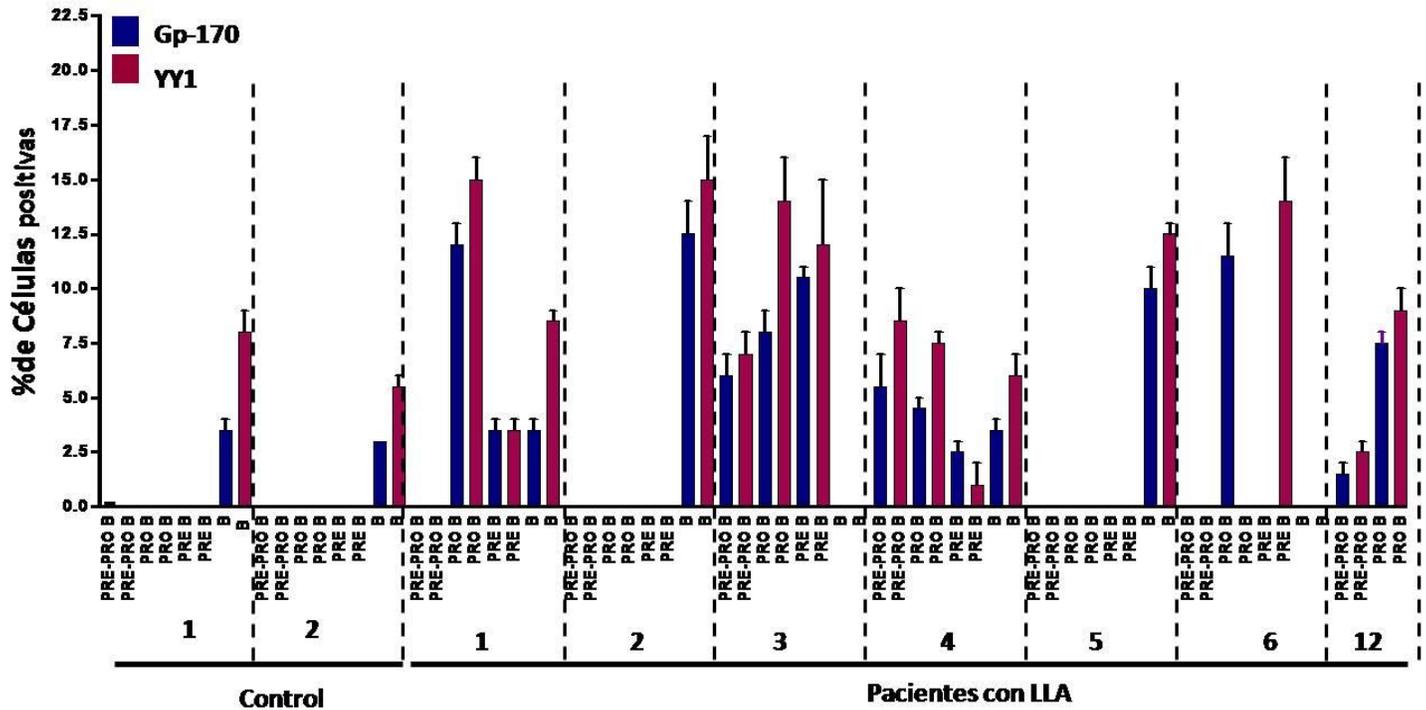


Figura 5. Análisis de citometría de flujo de la expresión de células positivas de YY1 y GP-170 en los diferentes estadios celulares del linaje B. Se muestra un incremento diferencial en el porcentaje de células positivas para ambas proteínas en los diferentes precursores celulares de los pacientes con LLA.

10.7. Asociación de la expresión de YY1 y Gp-170 en LLA de alto riesgo

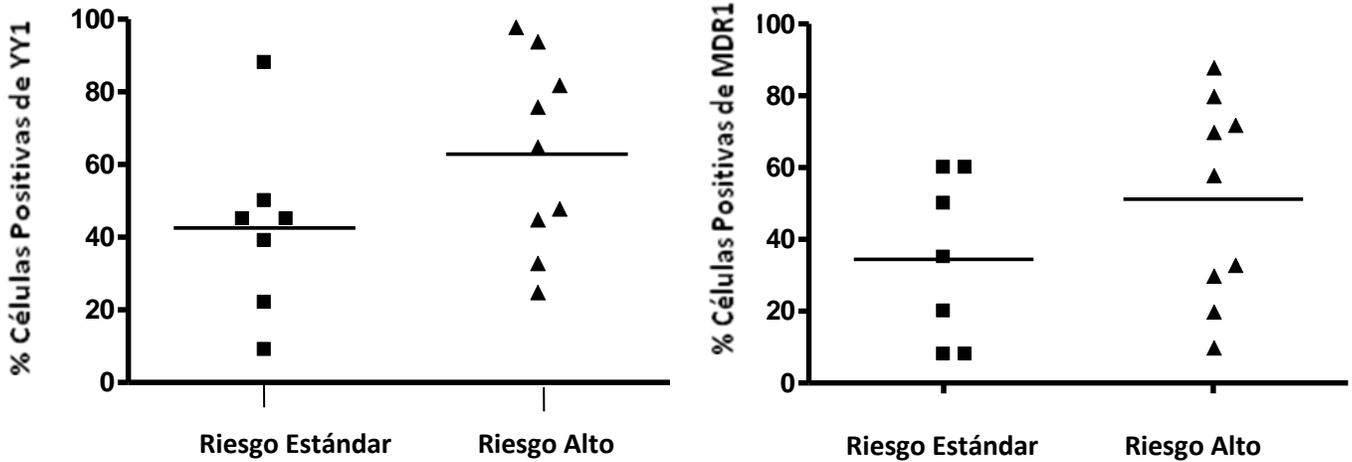


Figura 6. El porcentaje de la expresión de YY1 (a) y Gp-170(b) en las células de pacientes con LLA muestra una correlación con el grado de riesgo que presentan los pacientes, donde se observa que a mayor riesgo mayor expresión de YY1 y Gp-170 respectivamente. $p= 0.02$) t de Student.

10.8. Aumento en la expresión de YY1 y Gp-170 después de la quimioterapia

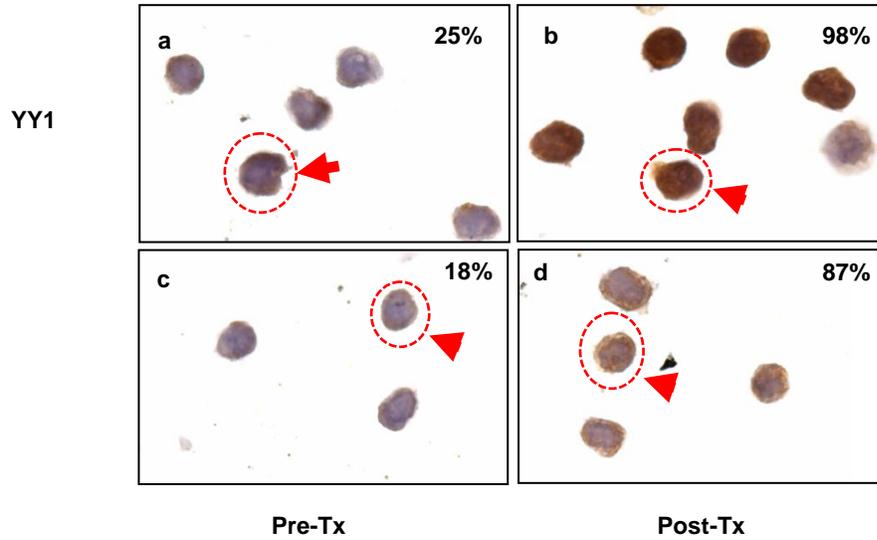


Figura 7. Microfotografías representativas de la sobre expresión de YY1 y Gp-170 en células de pacientes con LLA pre y post tratamiento. Se muestra claramente una sobre expresión de YY1 (b) y Gp-170(d) en las células de los pacientes con LLA después de la primera fase del tratamiento (inducción a la remisión) en comparación con las expresión de ambas proteínas en el mismo pacientes antes del tratamiento de un paciente clasificado como de alto riesgo (cromosoma Philadelphia positivo).

10.9. Evaluación final de la funcionalidad de los plásmidos

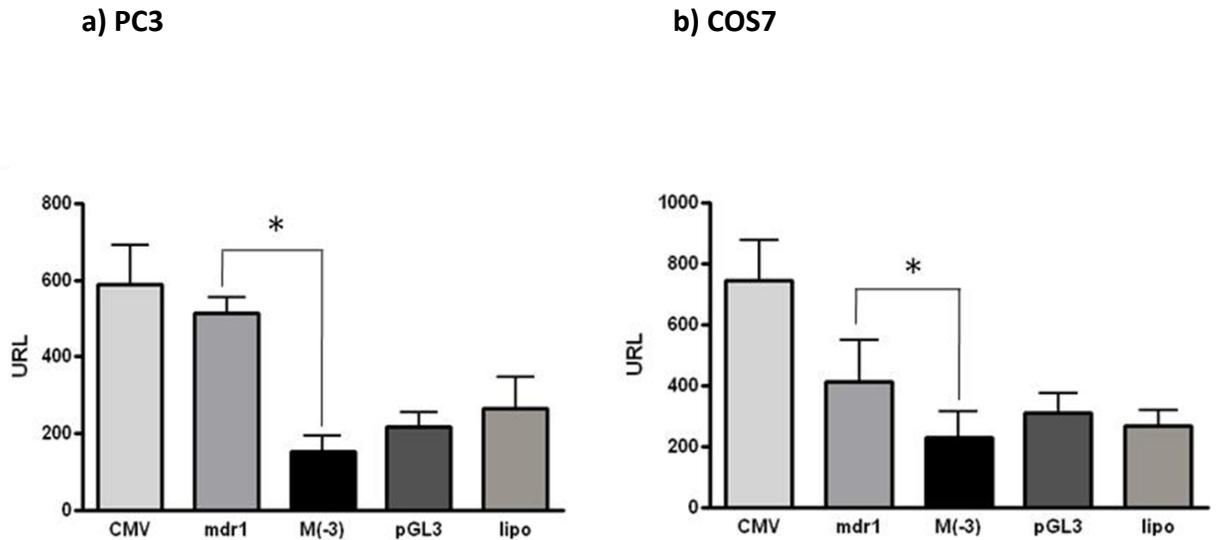


Figura 8. Ensayo de transfección final con los plásmidos MDR1/pGL3, M(-3) y CMV/pGL3.

En una placa de 24 pozos se mantuvieron en cultivo 2×10^5 células/pozo toda la noche a 37°C y 5% de CO_2 . Al día siguiente se transfectó cada línea celular con $1 \mu\text{g}$ de DNA plasmídico y lipofectamina 2000, se dejó en incubación durante 4 horas con esta mezcla, posteriormente se dejó nuevamente el cultivo toda la noche. La lectura de Unidades Relativas de Luciferasa (URL) se realizó empleando el Luciferasa Kit Assay (Promega), según las indicaciones del fabricante se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de Buffer de Lisis a cada pozo, se mantuvieron en agitación suave 15 minutos y se colectó el sobrenadante. Se tomaron $20 \mu\text{l}$ del lisado y se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de substrato en una placa de 96 pozos del luminómetro marca Turner Biosystems. Finalmente se aplicó un análisis estadístico de ANOVA no paramétrico con Tukey y confianza de 95%.

11. REFERENCIAS

1. SINAIS. El Sistema Nacional de Información en Salud. Estadísticas .Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAPO, 2002. Proyecciones de la Población de México, 2000 – 2050.
2. Organización Mundial de la Salud (abril 2005). 58ª Asamblea Mundial de la Salud: Prevención y Control del Cáncer. Informe de la Secretaria
3. La Asociación de Familiares y Amigos con Cáncer (AFANIC). El Cáncer en los Niños. Donde Actuamos. (citado 30 Agosto 2006). Disponible en: <http://www.afanic.com/index.html>
4. La Asociación de Familiares y Amigos con Cáncer (AFANIC). El Cáncer en los Niños. Donde Actuamos. (citado 30 Agosto 2006). Disponible en: <http://www.afanic.com/index.html>
5. Organización Mundial de la Salud (abril 2005). 58ª Asamblea Mundial de la Salud: Prevención y Control del Cáncer. Informe de la Secretaria
6. Medina-Sanson A, Martínez-Avalos A, Gallegos-Castorena S, Juárez-Villegas LE, González-Montalvo P, Perales-Arroyo A, et al. Pediatric oncology at Hospital Infantil de Mexico: fifty-five years of accomplishment. *Pediatr Hematol Oncol* 2002 Sep;19(6):383-7.
7. Video documental: "Verdades vulnerables" Leucemia infantil en México: problemática y soluciones. Tesis profesional presentada por Irene Dada Guerrero, Universidad de las Américas Puebla, Cholula, Puebla, México 11 de Mayo del 2005.
8. The Leukemia & Lymphoma Society
9. Dirección General de Información en Salud. Estadísticas de salud en niños y adolescentes. México, D.F.: Bol Med Hosp Infant Mex; 2004. Report No.: 4.
10. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997 Feb 1;349(9048):344-9.

11. Surveillance, Epidemiology, and End Results [SEER] Program, 2000-2004, National Cancer Institute, 2007.
12. Blanco Martín Aracelly, Monografía para obtener el título de especialidad de Pediatría. Factores predisponente para la recaída en niños con Leucemia Linfocítica aguda, tratados con el Protocolo LLA 2000, en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera, Marzo 2000 – Diciembre 2003, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985 Oct;103(4):620-5.
14. Lozano José Antonio, *Oncología*, 2002, Leucemias Agudas, Jun 2002, Vol 21, Núm6.117-122
15. Honrubia A Molinés, *Leucemias Linfoblásticas Agudas infantiles. Evolución histórica y perspectivas futura. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Materno-Infantil. Las Palmas de Gran Canaria. BSCP Can Ped* 2001; 25- nº 2.
16. Cáceres-Cortés Julio Roberto, *Mecanismos de resistencia a drogas en malignidades hematológicas, Rev.ciencia básica en hematología, Gac Méd Méx Vol. 136 Suplemento No. 2, 2000.*
17. Escriba PV, Ferrer-Montiel AV, Ferragut JA, Gonzalez-Ros JM. Role of membrane lipids in the interaction of daunomycin with plasma membranes from tumor cells: implications in drug-resistance phenomena. *Biochemistry* 1990 Aug 7;29(31):7275-82.
18. Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med* 1987 May 28;316(22):1388-93.
19. Haber DA. Multidrug resistance (MDR 1) in leukemia: is it time to test? *Blood* 1992 Jan 15;79(2):295-8.
20. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992 Dec 4;258(5088):1650-4.

21. Kuwano M, Toh S, Uchiumi T, Takano H, Kohno K, Wada M. Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance. *Anticancer Drug Des* 1999 Apr;14(2):123-31.
22. Fardel O, Lecreur V, Guillouzo A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol* 1996 Dec;27(8):1283-91.
23. Goldstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* 1996 Jun;32A(6):1039-50.
24. Jin S, Scotto KW. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol Cell Biol* 1998 Jul;18(7):4377-84.
25. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002 Jun 15;62(12):3387-94.
26. Latchman DS (1997). "Transcription factors: an overview". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (12): 1305–12.
27. Karin M (1990). "Too many transcription factors: positive and negative interactions". *New Biol.* 2 (2): 126–31.
28. Van Nimwegen E (2003). "Scaling laws in the functional content of genomes". *Trends Genet.* 19 (9): 479–84.
29. Evan G, Harrington E, Fanidi A, Land H, Amati B, Bennett M (August 1994). "Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene". *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 345 (1313): 269–75.
30. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (February 2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription". *Cell* 108 (4): 475–87.
31. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG (April 1999). "Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function". *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 (2): 140–7.
32. Robert O. J. Weinzierl (1999). *Mechanisms of Gene Expression: Structure, Function and Evolution of the Basal Transcriptional Machinery.* World Scientific Publishing Company.

33. Reese JC (April 2003). "Basal transcription factors". *Current opinion in genetics & development* 13 (2): 114–8.
34. Shilatifard A, Conaway RC, Conaway JW (2003). "The RNA polymerase II elongation complex". *Annual review of biochemistry* 72: 693–715.
35. Lobe CG (1992). "Transcription factors and mammalian development". *Current topics in developmental biology* 27: 351–83 .
36. Wheaton K, Atadja P, Riabowol K (1996). "Regulation of transcription factor activity during cellular aging". *Biochem. Cell Biol.* 74 (4): 523–34.
37. Meyyappan M, Atadja PW, Riabowol KT (1996). "Regulation of gene expression and transcription factor binding activity during cellular aging". *Biol. Signals* 5 (3): 130–8.
38. Evan G, Harrington E, Fanidi A, Land H, Amati B, Bennett M (August 1994). "Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene". *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 345 (1313): 269–75.
39. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*. 2006;25:1125-42.
40. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998 Aug 7;94(3):339-52.
41. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998 Sep 18;94(6):739-50.
42. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-776.
43. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathway. *Cancer Biol. Ther* 2005;4(2):139-163.
44. Kukhta VK, Marozkina NV, Sokolchik IG, Bogaturova EV. Molecular mechanisms of apoptosis. *Ukr Biokhim Zh* 2003;75(6)5-9.
45. Garban HJ, Bonavida B. Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a

- pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 2001 Jul 1;167(1):75-81.
46. Hongo F, Garban H, Huerta-Yepez S, Vega M, Jazirehi AR, Mizutani Y, et al. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Oct 21;336(2):692-701.
47. Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, Hanna S, Garban H, Roberts A, et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *Int J Oncol* 2005 Jul;27(1):131-41.
48. Van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000 Mar;38(3):94-110.
49. Francisco Arvelo, Elizabeth Merentes y Carlos Cotte, RESISTENCIA MULTIDROGA (MDR) O PLEIOTROPICA
50. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000 Jul 1;96(1):9-23.
51. Reporte Clínico, Depto de Hemato-oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.
52. Gómez C, Tapia L, Medel M, Náder E, Pérez D. Identificación, aislamiento y caracterización estructural del factor de transcripción yy1 en *Entamoeba histolytica*. IPN. 2001