



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA CII.



**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA PROTEÍNA GP-170 DE
RESISTENCIA MÚLTIPLE A FÁRMACOS (MDR) POR EL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN YIN-YANG-1 (YY1) EN LÍNEAS CELULARES DE
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

JESÚS FERNANDO RANGEL SANTIAGO

DIRECTOR: DRA. SARA HUERTA YEPEZ

CODIRECTOR: DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA

MARZO 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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación de Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la dirección de la Dra. Sara Huerta Yopez y con la asesoría de la Dra. Ma. de Lourdes Mora García de la Unidad de División de Investigación y Estudios de Posgrado, FES Zaragoza, UNAM.

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 JFRS durante la realización de esta tesis de licenciatura a través de la beca número 13719 durante el periodo abril – diciembre 2009. Este trabajo recibió financiamiento mediante el proyecto CONACYT 2007/C01/69789.



INDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
2.1	Cáncer infantil	3
2.2	Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	7
2.3	Etiopatogenia de la LLA	7
2.4	Clasificación de la LLA	8
2.5	Diagnóstico	10
2.6	Tratamiento	11
2.7	Resistencia a fármacos en LLA	12
2.8	Gen <i>mdr1</i>	13
2.9	El factor de transcripción YY1	15
2.10	Apoptosis y YY1	16
3.	Importancia del estudio	17
4.	Hipótesis	18
5.	Objetivo	19
5.1	General	19
5.2	Específicos	19
6.	Material y métodos	20
6.1	Determinación de sitios YY1 en el promotor de <i>mdr1</i>	20
6.2	Cepas bacterianas	20
6.3	Oligonucleótidos	20
6.4	Plásmidos	21
6.5	Líneas celulares	21
6.6	Reactivos para Inmunocitoquímica	21
6.7	Técnicas de ADN recombinante	22
6.8	Electroforesis	22
6.9	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
6.10	Digestión de DNA	23
6.11	Purificación de fragmentos	23
6.12	Purificación de plásmidos	23

6.13	Ligación de productos	24
6.14	Transformación de los productos de ligación	24
6.15	Identificación de las colonias transformadas	24
6.16	Transfección de líneas celulares PC3 y COS 7 con el DNA plasmídico	24
6.17	Inmunocitoquímica	25
6.17.1	Purificación de células de sangre periférica	25
6.17.2	Preparación de laminillas	25
6.17.3	Inmunotinción	26
6.18	Análisis estadístico	26
7.	Resultados	27
7.1	Identificación de sitios para YY1 en el promotor de <i>mdr1</i>	27
7.2	Obtención del promotor de <i>mdr1</i> y citomegalovirus (CMV)	28
7.3	Clonación de las secuencias promotoras de <i>mdr1</i> y CMV en el plásmido pGL3	29
7.4	Evaluación de la funcionalidad del promotor de <i>mdr1</i> en líneas celulares PC3 y COS 7	31
7.5	Evaluación de la importancia de los sitios de unión para YY1 en la secuencia promotora de <i>mdr1</i>	31
7.6	Evaluación de la expresión de YY1 y gp-170 en pacientes con LLA33	
8.	Discusión	35
9.	Conclusiones	41
10.	Perspectivas	42
11.	Figuras	43
Esquema 1.	a) Mapa del promotor del gen <i>mdr1</i> en humano	43
	b) Mapa del promotor del gen de CMV	44
Esquema 2.	Mapa del plásmido reportero pGL3	45
Esquema 3.	Estrategia de delección de los sitios de unión para YY1 en el promotor del gen <i>mdr1</i>	46
Figura 1.	Optimización de la técnica de amplificación para el promotor de <i>mdr1</i>	47
Figura 2.	Verificación de la secuencia del promotor de <i>mdr1</i>	48

Figura 3.	Obtención y verificación de la secuencia del promotor de CMV	49
Figura 4.	Preparación de insertos y del plásmido reportero pGL3 para la clonación	50
	a) Digestión del producto <i>mdr1</i> y del plásmido reportero pGL3	50
	b) Digestión del producto CMV y del plásmido reportero pGL3	51
Figura 5.	Análisis de restricción del plásmido MDR1/pGL3	52
Figura 6.	Análisis de restricción del plásmido CMV/pGL3	53
Figura 7.	Verificación de la obtención del plásmido MDR1/pGL3	54
Figura 8.	Verificación de la obtención del plásmido CMV/pGL3	55
Figura 9.	Evaluación de la funcionalidad del plásmido MDR1/pGL3	56
Figura 10.	Deleción de tres sitios de unión de YY1 en el promotor de <i>mdr1</i>	57
	a) Digestión del plásmido MDR1/pGL3 con enzimas de restricción Sma I y Xho I dentro de la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> para deletar tres sitios de unión para YY1	57
	b) Purificación de la secuencia de interés (5748 pb)	58
Figura 11.	Análisis de restricción del plásmido M(-3)	59
Figura 12.	Verificación de la obtención del plásmido M(-3)	60
Figura 13.	YY1 participa en la regulación del promotor del gen <i>mdr1</i>	61
Figura 14.	Expresión de YY1 y gp-170 en pacientes con LLA	62
Figura 15.	Correlación positiva entre YY1 y gp-170	63
12.	Referencias	64

1. RESUMEN

A nivel mundial y en México, el cáncer se presenta como la segunda causa de muerte en pacientes pediátricos. La leucemia es el tipo de cáncer mas frecuente en este grupo poblacional y representa el 35% de todas las neoplasias malignas en menores de 18 años. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) corresponde al 75% de todos los tipos de leucemia y del total de los niños que reciben tratamiento contra esta enfermedad, solo el 75% logra una remisión completa, el restante 25% fallece por diversas razones, sin embargo; ésta situación se debe principalmente al desarrollo de resistencia a los agentes quimioterapéuticos.

El desarrollo del fenotipo de resistencia múltiple a fármacos (MDR) se debe entre otros aspectos a la sobre expresión de transportadores de membrana dependientes de ATP que se expresan de manera fisiológica en la célula. El gen *mdr1* codifica para la glicoproteína P (gp-170) que pertenece a la superfamilia de transportadores ABC (ATP binding cassette). Esta proteína ha sido ampliamente estudiada y se ha reportado que en diversos tipos de cáncer, cuando se encuentra en niveles elevados provoca una concentración intracelular insuficiente de los fármacos, confiriendo resistencia en las células tumorales.

Diversos esfuerzos se han realizado con el fin de comprender los mecanismos a través de los cuales los factores de transcripción regulan la participación de genes involucrados en la resistencia a drogas anti-cancerígenas.

Nuestro grupo de trabajo tiene amplia experiencia en el estudio del factor de transcripción YY1, es bien conocido que YY1 juega un papel fundamental en procesos biológicos normales como embriogénesis, diferenciación, replicación y proliferación celular, sin embargo; diversos estudios han reportado que se encuentra relacionado con mecanismos de carcinogénesis.

Mediante una prueba de TESS (Transcription Element Search System), se determinó que el promotor del gen *mdr1* cuenta con cuatro sitios de unión para YY1.

Con base en los aspectos anteriormente expuestos, se decidió evaluar la participación de los sitios de unión para YY1 en el promotor del gen *mdr1*.

Se realizó la clonación del promotor de *mdr1* en el plásmido reportero pGL3. Evaluada la funcionalidad de dicho promotor, se procedió a la delección de tres sitios de unión para YY1 en la secuencia promotora de *mdr1*. De esta manera, mediante ensayos de transfección en las líneas celulares PC3 y COS 7, se encontró que la actividad del promotor de *mdr1* se ve disminuida como resultado de la delección de tres sitios de unión.

Para corroborar los datos obtenidos por biología molecular, se evaluó mediante inmunocitoquímica la expresión de YY1 y de gp-170 en células mononucleares de sangre periférica de 10 pacientes pediátricos con LLA que no habían recibido tratamiento alguno. Los resultados nos permiten corroborar que existe una correlación directa entre YY1 y la expresión de gp-170.

Este estudio sugiere que YY1 está regulando de manera transcripcional la expresión de gp-170 y probablemente confiriendo el fenotipo MDR en células leucémicas.

Sin embargo, es necesario completar el sistema de plásmidos reporteros que incluyan la delección de los demás sitios de unión para YY1 en la secuencia promotora de *mdr1*, así como realizar estudios complementarios de RNA de interferencia e inmunoprecipitación de la cromatina.

Si logramos comprender mejor las bases moleculares de los mecanismos encargados de conferir resistencia a fármacos en pacientes pediátricos con LLA, se podría emplear a YY1 y a la gp-170 como factores pronósticos o incluso como blancos terapéuticos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer Infantil

En las últimas dos décadas la epidemiología de la patología infantil ha cambiado de manera importante. Hace casi dos décadas las principales causas de mortalidad infantil estaban relacionadas con procesos infecciosos agudos, principalmente gastroenteritis y bronconeumonía; actualmente el cáncer representa la segunda causa de mortalidad en niños a nivel mundial (1) como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Mortalidad en la población escolar (4-15 años de edad) en México (4)

Orden	Causa	Defunción	Tasa (n)
1	Accidentes	2 561	11.8
2	Cáncer	1 651	7.6
3	Anomalías congénitas	469	2.2
4	Neumonías	375	1.7
5	Homicidio y lesiones	339	1.6
6	Infección intestinal	264	1.2

* Tasa por 100 000 habitantes de 4 a 15 años de edad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que a nivel mundial se diagnostican alrededor de 10 millones de casos nuevos de cáncer por año (2). Este grupo de padecimientos es ligeramente más numeroso en los países desarrollados que en los que están en vías de desarrollo. Se dice que el aumento del cáncer en la población infantil se debe al esfuerzo de los gobiernos federales por desarrollar campañas efectivas de inmunización a nivel nacional, programas de hidratación oral para el tratamiento de las gastroenteritis y porque se presta mayor atención al diagnóstico y tratamiento temprano en las neumonías de la población preescolar, así como la referencia y atención oportunas del recién nacido de alto riesgo a centros hospitalarios (3). Estos aspectos han conseguido que la población infantil por debajo de los cuatro años viva sanamente durante este tiempo y en consecuencia el niño que rebasa esta edad sea más propenso a desarrollar cáncer (4).

La mayor incidencia de cáncer se encuentra entre los cuatro y nueve años de edad (5). En México, la tasa señalada por organismos nacionales marca que el cáncer entre los 4 y 15 años de edad tiene una incidencia de 122 casos nuevos/millón/año, denotando que el cáncer infantil es un problema nacional de salud y que nuestro país se encuentra entre los países que reportan mayor incidencia como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Incidencia de cáncer en menores de 15 años en México, comparado con otros países (4)

País	Incidencia
India	50/Millón/año
China	80/Millón/año
Polonia	100/Millón/año
México	122/Millón/año
Canadá	130/Millón/año
EUA	148/Millón/año

En el año 2000, en México se reportó una mortalidad en números absolutos de 70 000 niños de 0-5 años. Se estima que durante el año 2009 la tercera parte de los pacientes falleció sin haber recibido un diagnóstico y por lo tanto sin tratamiento. Otra tercera parte recibió tratamientos incompletos por falta de recursos financieros por parte de los padres de los pacientes o de las instituciones de salud y sólo la tercera parte restante recibió tratamiento adecuado (6).

Actualmente la población en México es de 107.6 millones de habitantes de acuerdo al Consejo Nacional de Población (CONAPO), de esta población el 45.1% tiene menos de 18 años de edad (6). Por lo tanto, el sector salud se ve en la necesidad de tomar el cáncer infantil como un problema nacional de salud.

Es importante señalar que en países en desarrollo el 75% de las neoplasias malignas son curables, lo que significa que un 25% de los pacientes fallecerá por progresión de la neoplasia maligna o como consecuencia de las complicaciones del tratamiento. Mientras que en los países desarrollados tres de cada cuatro niños con cáncer sobreviven al menos cinco años después de ser diagnosticados (7). En la tabla 3 se muestra la incidencia de cada tipo de cáncer en edad pediátrica.

Tabla 3. Incidencia del cáncer infantil en México (7)

Tipo	Incidencia (%)
Leucemia	34.5
Linfomas	19.5
Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC)	16.0
Retinoblastoma	8.5
Osteosarcoma	6.5
Tumor de Wilms	5.0
Otros	10.0

La leucemia es el padecimiento maligno más frecuente a nivel mundial, representa aproximadamente el 35% de todas las neoplasias malignas entre los 0 y los 18 años de edad (8). Las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación y el crecimiento incontrolado de células linfoides o mieloides inmaduras. Se desconoce la base molecular de la transformación leucémica, pero se piensa que en muchos casos un progenitor leucémico con capacidad de auto-renovación indefinida sufre una transformación maligna por una mutación somática espontánea o inducida por agentes radioactivos, químicos o infecciosos y da origen a precursores poco diferenciados (blastos) que han perdido su capacidad de diferenciarse en respuesta a estímulos fisiológicos normales y que poco a poco se vuelven una célula predominante en la circulación (9).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) corresponde al 75% de todas las formas de leucemia aguda (10).

Su incidencia varía de 3 a 5 casos/10 000/año y se ha observado mayor prevalencia en los lugares que cuentan con grandes extensiones agrícolas que utilizan insecticidas y fertilizantes (10).

En un estudio multicentro, en donde se analizaron retrospectivamente 4 956 casos de neoplasias malignas en etapa infantil registrados en instituciones de tercer nivel de la ciudad de México, en un periodo de 11 años (1980 a 1991), se documentó que las neoplasias más frecuentes fueron las leucemias con 1 706 casos (34.4%), siendo la LLA la más prevalente con 1 421 casos lo que representa el 83.3% de las leucemias, seguida de la leucemia mieloblástica aguda (LMA) con 271 casos que representa el 15.9% de las leucemias (11).

Por otro lado, un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) en conjunto con el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), comparado con un estudio realizado por otras instituciones de salud en México incluyendo el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), durante el periodo de 1980-1995 respalda el hecho de que las leucemias representan la neoplasia más frecuentes en la edad pediátrica con el 34.4% de los casos; en comparación con Estados Unidos en donde las leucemias representan el 30% (Tabla 4) (12).

Tabla 4. Frecuencias de neoplasia en pacientes pediátricos (12)

Diagnóstico	INP (%)	HIMFG	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
Tumores de sistema nervioso central	10	14	10	19
Tumores óseos	6	5.3	6.5	5
Tumores renales	5	4.8	5.6	6
Tumores de células germinales	3	3.8	5.1	-
Sarcomas	3	3.7	4.8	7
Neuroblastoma	2	1.9	2.7	8
Otros	5	2.7	1.4	9

2.2 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

La LLA es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia a nivel mundial. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se atienden cada año alrededor de 100 casos nuevos de LLA y constituye el 34.4% de todos los casos de cáncer tratados en dicha institución (13). La LLA afecta con mayor frecuencia al género masculino que al femenino, las manifestaciones clínicas de la LLA son muy variables y dependen de la edad del paciente y del ritmo de crecimiento de las células leucémicas (14, 15).

Los signos clínicos más comunes son la anemia, neutropenia y trombocitopenia. La palidez, la fatiga, petequias, púrpura, manifestaciones de sangrado y fiebre son frecuentes. En ocasiones las manifestaciones predominantes son el dolor óseo y artralgias. A medida que la enfermedad avanza las células leucémicas invaden no sólo los órganos implicados en la hematopoyesis como el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y el timo, además llegan a afectar todos los tejidos, incluso los menos accesibles como el sistema nervioso central o las gónadas (16).

2.3 Etiopatogenia de la LLA

La LLA es una alteración citogenética en la cual una serie de eventos mutagénicos determinan la pérdida de los mecanismos que regulan la división y diferenciación celular, ocasionando la expansión monoclonal de una célula precursora de la serie linfoide (17).

A pesar de la frecuencia de esta enfermedad y del conocimiento de algunos factores ambientales implicados en el desarrollo de la misma, la etiología de esta neoplasia es desconocida. Se han descrito padecimientos que predisponen al desarrollo de LLA, como son los síndromes de Down, de Bloom, de Swachman, la Ataxia-telangiectasia y algunos otros trastornos con fragilidad cromosómica (18). Se han observado también situaciones en las que la LLA ocurre con mayor frecuencia, entre las cuales se encuentran el sexo masculino, la edad entre 2 y 5 años, la raza blanca, el estado socioeconómico elevado, la exposición *in útero* y postnatal a radiación ionizante. También se han identificado factores

con riesgos relativos menores, como el peso elevado al nacer, la edad materna avanzada y la historia de abortos previos. A pesar de los avances tecnológicos, aún se desconocen con exactitud los factores que causan leucemia (18).

2.4 Clasificación de la LLA

El estudio de diversas características detectables en las células leucémicas ha permitido la clasificación de esta neoplasia desde los puntos de vista morfológicos, inmunológicos y citogenéticos (19).

A) 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. Un 80% de los niños con LLA tienen morfología tipo L1, caracterizada por blastos pequeños, con escaso citoplasma, cromatina homogénea, sin vacuolas y nucléolos ausentes o poco prominentes. Alrededor de 20% son de tipo L2, cuyos blastos tienen forma heterogénea, pueden presentar prolongaciones citoplasmáticas y nucléolos que varían en cantidad y tamaño. El 1% de todos los casos corresponde a las leucemias tipo L3 o Burkitt que se caracterizan por blastos de núcleo regular, oval o redondo, con uno o más nucléolos y citoplasma intensamente basófilo con vacuolas prominentes (19).

B) Clasificación Inmunológica.- El desarrollo de la tecnología con anticuerpos monoclonales ha permitido un mayor conocimiento y entendimiento de las leucemias. El análisis de la expresión de antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares en las células leucémicas empleando estos anticuerpos monoclonales ha generado el conocimiento para su clasificación en función del linaje y la fase de maduración de la célula que origina la proliferación monoclonal (20). A través de la medición del porcentaje de positividad para ciertos antígenos, los anticuerpos monoclonales permiten establecer si se trata de una leucemia de linaje B o T. El linaje B, que representa de un 80% a un 85% de la LLA se define por la expresión de antígenos CD19, DR, CD10 (antígeno común de la LLA o CALLA) y otros antígenos asociados a células B.

Existen cuatro subtipos mayores de LLA de linaje B: pre B temprana, pre B, pre B transicional y B madura. La LLA de células T expresa antígenos CD2, CD7, CD5 o CD3 y constituye el 15% de los casos. Aunque la mayoría de los casos expresan marcadores que les identifican como pertenecientes a un linaje específico, existen situaciones en las que se expresan marcadores tanto de células T como B (20).

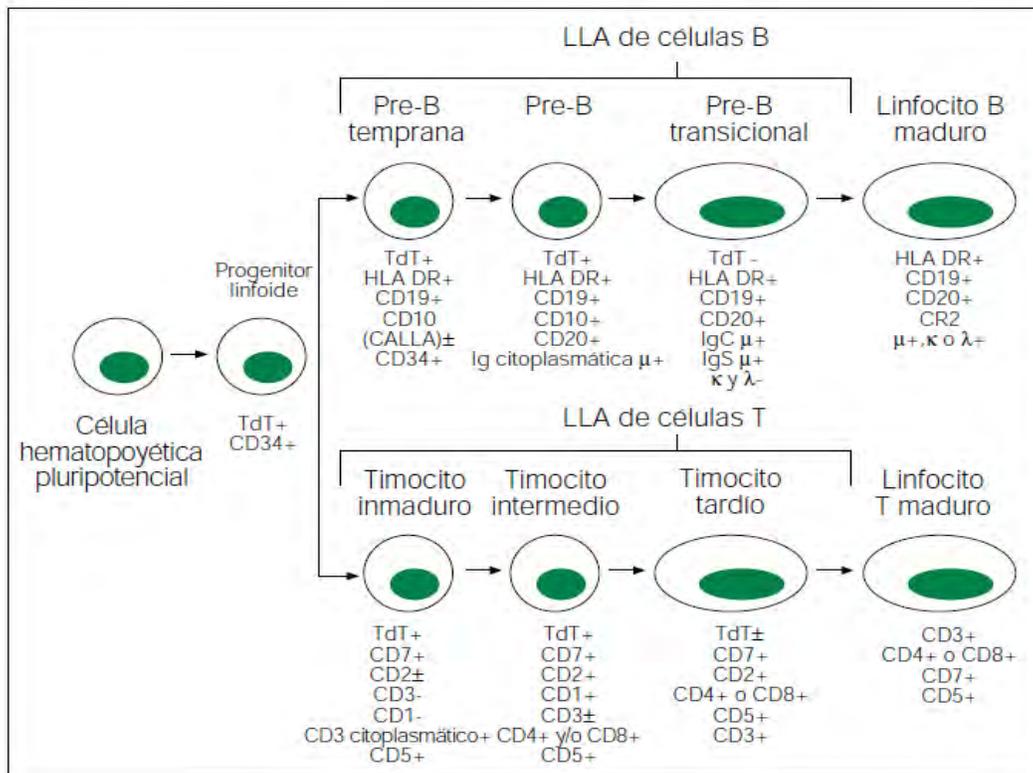


Figura 1. Modelo de diferenciación linfocitaria basado en los estados de maduración por presencia de antígenos en la superficie celular (19)

C) Clasificación Citogenética.- 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 (20) como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Traslocaciones cromosómicas más frecuentes en LLA (19)

Traslocación	Frecuencia	Genes Afectados	Características
t(1:19)(q23;p13)	5-6%	E2A-PBX1	Fenotipo pre-B. Hiperleucosistosis. Pronósticos pobre, necesario tratamiento intensivo.
t(9:22)(q34;p11)	3-5%	BCR-ABL	Cromosoma Philadelphia. Mal pronóstico. Hiperleucosistosis.
t(4:11)(q21;p23)	2%	MLL-AF4	Estirpe B, asociado a LLA lactante. Hiperleucosistosis. Pronóstico pobre.
t(12:21)(p13;q22)	25% de LLA pre-B	TEL-AML	Fenotipo B. buen pronóstico.

2.5 Diagnóstico

La evaluación diagnóstica de un paciente con sospecha de leucemia aguda inicia con la realización de una biometría hemática completa en la que deben analizarse los niveles de hemoglobina, las cifras de plaquetas y leucocitos. Se encuentra anemia hasta en 80% de los casos; las plaquetas están por debajo de 100 000 en 75% de los casos y existen cuentas bajas o elevadas de leucocitos hasta en la mitad de los pacientes. Los hallazgos anteriores, además de la revisión del frotis de sangre periférica, son de gran utilidad en la decisión de realizar aspirado de médula ósea (MO) que es donde se establece el diagnóstico de certeza. La FAB marca como criterio para el diagnóstico de leucemia aguda el hallazgo de más de 30% de blastos en médula ósea (21).

2.6 Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con LLA está adaptado al riesgo del paciente, es decir; se administrará un tratamiento intensivo al paciente que tiene mayor riesgo de recaída al diagnóstico y no se dará un tratamiento excesivo al paciente de riesgo estándar. El tratamiento comprende tres fases: inducción, intensificación (consolidación) y mantenimiento. La duración global es de un mínimo de dos años (22).

A) Inducción.- El objetivo inicial del tratamiento es inducir una remisión completa imprescindible para tener una supervivencia prolongada. Un paciente está en remisión completa cuando no existe evidencia de leucemia en su exploración física, ni en el examen de sangre periférica o en MO (menos del 5% de blastos MO) (22).

B) Intensificación (consolidación).- Consiste en la administración de un tratamiento intensivo inmediatamente tras finalizar la inducción. Los pacientes ingresan en el hospital durante períodos de 4-6 días para recibir los ciclos de quimioterapia.

Posteriormente, se realiza una reinducción, que consiste en la repetición del tratamiento de inducción con ligeras modificaciones a los tres meses de adquirir la remisión completa (22).

C) Mantenimiento.- Se ha comprobado que al analizar células de pacientes que están en aparente remisión completa, se puede encontrar enfermedad mínima residual. Es por ello que los tratamientos de mantenimiento se continúan al menos durante dos años, con reevaluaciones frecuentes para la detección de recaídas. El tratamiento estándar de mantenimiento consiste en la administración de mercaptopurina oral a diario y de metotrexato semanal oral, antimetabolitos que tienen como objetivo evitar que las células tumorales continúen su crecimiento. Los pacientes realizan el tratamiento de forma ambulatoria, acudiendo a sus revisiones cada 2-4 semanas. Durante el mismo, reciben profilaxis anti-infecciosa con cotrimoxazol tres días a la semana. Pueden acudir a la escuela y realizar una vida prácticamente normal (22).

A pesar del enorme avance en los tratamientos, solo el 75% de las neoplasias malignas podrá lograr una recuperación total, el resto fallecerá por progresión de la neoplasia o como consecuencia de las complicaciones del tratamiento (2).

2.7 Resistencia a fármacos en LLA

Las señales iniciadas en la superficie celular tras la activación de los receptores de factores de crecimiento y citocinas deben ser transducidas a través del citoplasma hasta llegar al núcleo, donde regulan la transcripción de genes. Así, la represión y activación de la transcripción de estos genes son esenciales para dar la respuesta pertinente a las señales que inciden en la célula. Por lo que es razonable pensar que determinados factores de transcripción ejerzan papeles clave en la regulación de procesos de proliferación celular, inducción de apoptosis y/o reparación del DNA, cuya alteración está asociada a los procesos tumorales (23, 24).

El desarrollo de resistencia es uno de los principales obstáculos durante el uso de quimioterapia para el tratamiento del cáncer (25). Aproximadamente el 30% de los niños en tratamiento para LLA no responden al tratamiento o desarrollan resistencia durante la fase de inducción; lo que resulta en un desenlace desfavorable para el paciente (26).

Existen diversos mecanismos celulares asociados a la expresión de la quimioresistencia:

- 1.- Aumento en la expresión de los genes que codifican para la enzima sobre la que el fármaco ejercerá su efecto (o enzima “blanco” del fármaco),
- 2.- Cambios estructurales y funcionales de la enzima blanco de los fármacos,
- 3.- Inhibición de los procesos de apoptosis;
- 4.- Disminución de los niveles intracelulares de la droga a través de transportadores de membrana (27).

Para el caso de inhibición de apoptosis, se ha reportado que la proteína survivina juega un papel muy importante en este proceso, porque es altamente expresada en diversos tipos de cáncer. El incremento en los niveles de survivina es asociado con la progresión de enfermedades malignas, resistencia a fármacos y pronóstico desfavorable para los pacientes (28). Por otro lado, se ha descubierto que la inhibición de esta proteína reduce el crecimiento de las células tumorales, induce su muerte y sensibilización a la quimioterapia (29). Otros estudios en células de cáncer de colon sugieren que la expresión de survivina puede ser parcialmente regulada por el factor celular T (TCF) dependiente de β catenina. El factor de transcripción KLF5 (Kruppel-like factor 5) es el encargado de regular la señalización involucrada en la proliferación celular y oncogénesis. La región principal del promotor de la survivina contiene varias cajas GT, que han sido caracterizadas como elementos de respuesta a KLF5. Al unirse p53 a KLF5 es capaz de reprimir la expresión de la survivina (29). La desregulación de esta vía puede resultar en una sobre expresión de survivina, contribuyendo así a la resistencia a las drogas en cáncer (30).

Diversos estudios han demostrado que la participación de transportadores de membrana juega un papel aún más importante en los mecanismos de resistencia a la quimioterapia (30). Los transportadores ABC (ATP binding cassette), utilizan energía de la hidrólisis del ATP para disminuir los niveles citoplasmáticos de sus sustratos y uno de los representantes más estudiados en la superfamilia de transportadores ABC, asociado a quimioresistencia, es la glicoproteína P ([*P-glicoprotein* o gp-170] (28, 29).

2.8 Gen *mdr1*

El gen *mdr1* (multidrug resistance 1) codifica para la proteína gp-170, la cual se expresa de manera constitutiva en tejido normal y su función fisiológica es la de una bomba de expulsión dependiente de ATP (31). Algunos de los tratamientos más utilizados en las leucemias incluyen: antraciclina, vinca alcaloides y podofilinas, las cuales son sustrato para la gp-170. La sobre-expresión de esta proteína, induce un flujo excesivo de los fármacos y por tanto una concentración intracelular insuficiente de estos agentes aún en dosis máximas, lo que deriva en resistencia a diversos fármacos quimioterapéuticos (32).

Se han encontrado niveles elevados de la gp-170 en tumores de pacientes con cáncer de ovario, leucemia aguda y otros tipos de cáncer (33). Diversos estudios han propuesto que la expresión del RNA mensajero de *mdr1* se correlaciona con la severidad del tumor y con la resistencia a las drogas después de iniciada la quimioterapia (34).

Uno de los mecanismos que desarrollan las células leucémicas es la presencia del fenotipo MDR (multi drug resistance) (35). Se considera que el fenotipo MDR generalmente se adquiere después de la administración de agentes quimioterapéuticos y es muy prevalente en la LLA. Este fenotipo es asociado con la inducción del gen *mdr1* (36). El gen *mdr1* es expresado en algunos tipos de células normales (por ejemplo, células del epitelio intestinal y linfocitos), pero su sobre-expresión se correlaciona con resistencia a diferentes drogas (37). 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 (37).

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 (38). Se ha demostrado una regulación negativa de *mdr1* por la subunidad p65 de NF- κ B (nuclear factor Kappa B) acoplado a *c-fos* (39) y por p53 (40). Otros estudios han demostrado que 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 cáncer como el de ovario y próstata (41).

A pesar de lo anterior, hasta el momento no está completamente entendido cual es el mecanismo de regulación transcripcional de esta proteína (33).

Diversos esfuerzos se han realizado para tratar de entender los mecanismos a través de los cuáles los factores de transcripción regulan la participación de genes involucrados en resistencia a drogas anti-cancerígenas (23, 34). La existencia de algoritmos que ayudan a predecir si una secuencia promotora en particular tiene sitios consenso de unión a factores de transcripción específicos ha sido de gran utilidad (34).

Previamente nuestro grupo de trabajo empleo 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, para analizar 2000 nucleótidos río arriba de la secuencia ATG (sitio de inicio de la transcripción) del promotor del gen *mdr1* para predecir los factores de transcripción presente en esta región. Se encontraron cuatro sitios de unión para el factor de transcripción Ying-Yang 1 (YY1) en el promotor del gen *mdr1* ubicados a -270 (12), -1230 (7.88), -1420 (8.49) y -1860 (12), lo cual sugiere que YY1 puede participar en la regulación transcripcional de dicho gen.

2.9 El factor de transcripción Yin Yang 1 (YY1)

YY1 juega un papel fundamental en procesos biológicos normales como embriogénesis, diferenciación, replicación y proliferación celular, sin embargo también se encuentra fuertemente relacionado con mecanismos de carcinogénesis (42).

El marco de lectura del cDNA de YY1 en humanos codifica para una proteína de 414 amino-ácidos (aa) con peso molecular de 68 kDa. YY1 está constituido por cuatro dedos de zinc C_2H_2 y posee la propiedad inusual de regular la transcripción en diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa o inicia la transcripción (42). Entre los genes que activa se incluyen *IFN- α* , *β -caseína*, *c-fos* y *c-myc*, así como también los promotores de diversos virus entre los cuales podemos citar el promotor de citomegalovirus (CMV), el virus de la leucemia murina (MLV) y virus del papiloma humano (HPV) (43). En relación al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se sabe que YY1 regula de manera negativa la expresión de CXCR4 y CCR5 los cuales actúan como co-receptores de entrada a la célula para este virus, la activación de YY1 entonces induce una disminución en la expresión de estos receptores en la superficie celular y por tanto también disminuyen la infección por VIH. 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 (43).

2.10 Apoptosis y YY1

El factor de transcripción YY1 es transportado rápidamente dentro del núcleo celular en respuesta a varios estímulos de apoptosis. Los mecanismos involucrados son: sub-regulación de la actividad de p53, interferencia con poli-ADP-ribosa polimerasa, alteración en c-myc, expresión de 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 (44). 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 carcinomas, hepatocarcinoma y retinoblastoma (44, 45, 46).

Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo en colaboración con la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA) USA, han demostrado que YY1 regula la transcripción del gen Fas uniéndose a la región silenciadora de su promotor. La sobre-expresión de Fas, induce la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor. (46). El tratamiento de líneas celulares tumorales con un donador de óxido nítrico induce la sobre expresión de Fas, ya que el óxido nítrico inactiva al factor de transcripción YY1 que funciona como represor de Fas (46). Otros trabajos en líneas celulares de cáncer de próstata y de ovario demostraron que YY1 regula también de forma negativa la expresión de DR5, que es uno de los receptores para TRAIL (receptor de superficie celular participante en la vía extrínseca de inducción de apoptosis). Estos resultados fueron obtenidos mediante estudios del promotor clonado en plásmidos reporteros, ensayos con RNA de interferencia e inmunoprecipitación de la cromatina (47).

Por otro lado, se demostró que líneas celulares de cáncer de próstata resistentes a tratamiento presentan 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 (48). Dichos estudios sugieren que probablemente YY1 es un mecanismo de resistencia a la apoptosis desarrollada por las células tumorales. Actualmente no existen estudios que muestren la participación de YY1 en la fisiopatogénesis de la LLA.

A4. Importancia del estudio

A nivel mundial, el cáncer es la segunda causa de muerte en la población infantil, antecedida únicamente por la muerte por accidentes. De los diversos tipos de cáncer en edad pediátrica, la LLA tiene la mayor incidencia. Del total de la población mexicana de 107.6 millones de habitantes, el 45% tiene menos de 18 años y la leucemia se presenta como la neoplasia de mayor incidencia en la niñez, correspondiendo el 75% de todos los tipos de leucemia a la LLA; por lo que representa un problema nacional de salud.

A pesar del conocimiento de algunos factores ambientales implicados en la leucemogénesis, la etiología de esta neoplasia es desconocida. Se estima que el 30% de los pacientes tienden a desarrollar resistencia a la quimioterapia después de iniciado el tratamiento y por tanto presentan un desenlace desfavorable.

El gen *mdr1* está involucrado en la expresión de la proteína gp-170 que se asocia con el desarrollo del fenotipo de resistencia múltiple a fármacos.

Como parte del esfuerzo para revertir esta situación, se intenta buscar nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos. En este trabajo se estudió la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación transcripcional del gen *mdr1*, lo cual puede repercutir en la expresión de gp-170, una de las proteínas responsables de la resistencia a la quimioterapia.

A5. HIPOTESIS

El factor de transcripción YY1 podría participar de manera positiva en la regulación del gen *mdr1*, induciendo la sobreexpresión de la gp-170, lo cual puede conferir resistencia en la LLA pediátrica.

A6. OBJETIVO

5.1 General

Analizar la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación del gen *mdr1*, así como la expresión de YY1 y gp-170 en CMN de pacientes pediátricos con LLA.

5.2 Específicos

- 1) Estudiar la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación del gen *mdr1* mediante ensayos con plásmidos reporteros.
- 2) Determinar la expresión de YY1 y de la proteína gp-170 en CMN en sangre periférica de pacientes con LLA mediante la técnica de inmunocitoquímica.

A7. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Determinación de sitios YY1 en el promotor de *mdr1*

La predicción de los sitios de unión para YY1 en el promotor del gen *mdr1* se realizó mediante el programa TESS, se analizaron 2000 nucleótidos río arriba de la secuencia ATG del promotor del gen *mdr1*.

6.2 Cepas bacterianas

Se empleó la siguiente cepa bacteriana para la propagación de los plásmidos estudiados:

CEPA	MARCA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Gibco BRL, Invitrogen USA

6.3 Oligonucleótidos

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar las secuencias de DNA que fueron analizadas. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Invitrogen Corporation, USA.

NOMBRE	SECUENCIA	CARACTERÍSTICAS
MDR1	5' CCAA <u>GGTACC</u> GCTAACACAGTGAAAAAACCAG 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , contiene el sitio de restricción Kpn I.
MDR2	5' CCAA <u>AAGCTT</u> CCGACCTGAAGAGAAACC 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , contiene el sitio de restricción Hind III.
pCMV PF	5' TATATACTCGAGCTGCTTATAT <u>AGAC</u> CTCCACCG 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen CMV, contiene el sitio de restricción Xba I.
pCMV PR	5' CATACATCTAGAACGGGGTCATT <u>AGTT</u> CATAGCC 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen CMV, contiene el sitio de restricción Xho I.

6.4 Plásmidos

NOMBRE	TAMAÑO	CARACTERÍSTICAS
pGL3	4818 pb	Plásmido reportero de clonación (Promega Corporation, USA).
CMV/pGL3	5418 pb	Contiene la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV).
MDR1/pGL3	6818 pb	Contiene la secuencia completa del promotor de <i>mdr1</i> .
M(-3)	5748 pb	Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> , con la delección de tres sitios de unión para YY1.

6.5 Líneas celulares

LINEA CELULAR	CARACTERÍSTICAS
PC3	Línea celular obtenida a partir de adenocarcinoma de próstata, grado IV. Con crecimiento adherente, con aplicación en ensayos de transfección (ATCC: CRL-1435).
COS 7	Línea celular obtenida a partir de fibroblastos de riñón de mono africano, apropiada para ensayos de transfección (ATCC: CRL-1651).

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI ADVANCED (GIBCO, Invitrogen USA), suplementado con L-glutamina, piruvato, penicilina, antibiótico-antimicótico y complementado con SFB al 5%. A 37°C en un ambiente de CO₂ al 5%.

6.6 Reactivos para Inmunocitoquímica

REACTIVO	APLICACIÓN
IgG Normal de conejo (Santa Cruz, Biotechnology).	Control de isotipo.
Anticuerpo policlonal Anti-MDR1 de humano hecho en conejo (Santa Cruz, Biotechnology).	Anticuerpo primario.
Anticuerpo policlonal Anti-YY1 de humano hecho en conejo (Santa Cruz, Biotechnology).	Anticuerpo primario.
Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DAKO Cytomation).	Solución para revelar.

6.7 Técnicas de DNA recombinante

La preparación del DNA, la manipulación genética, la reacción en cadena de la polimerasa, la transformación bacteriana y la electroforesis en geles de agarosa se realizaron de acuerdo a las especificaciones y protocolos del Manual de Laboratorio de Clonación Molecular Sambrook y según las recomendaciones de los kits empleados.

6.8 Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en agarosa (UltraPure, GIBCO) al 1%, en una cámara horizontal (BIO-RAD Laboratories, USA) con 1 µg de DNA a 80V (15V/cm³) durante 45 min empleando como amortiguador de corrimiento TAE 1X (Tris-acetato de potasio 0.04 M, EDTA 0.001 M). La agarosa se tiñó con 1 µl de bromuro de etidio, al terminar de correr el gel se fotodocumentó en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

6.9 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de las secuencias empleadas en el protocolo se realizó con el equipo Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Germany). Se emplearon oligonucleótidos específicos para cada secuencia (20 pmol), DNA genómico como molde (1000 ng) y 1.5 U de la enzima Pfx (Invitrogen Corporation, USA). La reacción se llevó a un volumen final de 25 µl de agua inyectable (GI), con 35 ciclos de desnaturalización, polimerización y amplificación a 72°C. Se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis y finalmente fue fotodocumentado.

6.10 Digestión de DNA

Las digestiones se realizaron en un volumen final de 100 μ l, en tubos de 1.5 mL (Eppendorf) durante dos horas a 37°C, con aproximadamente 10,000 ng de DNA, adicionando 10U de la enzima de restricción, 5 μ l de amortiguador, 3 μ l de Albumina Sérica de Bovino si lo especificaba el fabricante y el volumen restante de agua inyectable.

6.11 Purificación de Fragmentos

Los fragmentos se obtuvieron a partir de los geles de agarosa y fueron depositados en tubos de 1.5 mL (Eppendorf) para su purificación mediante el Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen Corporation, USA). Brevemente, se agregaron 600 μ l de reactivo de solubilización, incubándose a 50°C hasta que la agarosa se disolvió. Se pasó la muestra por la columna de purificación, centrifugando a 12,000 g durante 1 min. Se adicionaron 600 μ l de buffer de lavado, incubando 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente. Para obtener el DNA se agregaron 50 μ l de agua inyectable y se colectaron en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) nuevo mediante centrifugación. Finalmente se realizó la electroforesis para verificar la presencia del DNA.

6.12 Purificación de Plásmidos

Los plásmidos se purificaron empleando el Pure Link HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se calibró la columna adicionando 2 mL del reactivo EQ1, se centrifugó la muestra a 10,000 g durante un minuto. Se agregaron buffer P1, P2 y P3 (200 μ l de cada uno) al botón celular. Se centrifugó la muestra diez min a 15,000 g y se colectó el sobrenadante. Se adicionaron 600 μ l de isopropanol frío (Grado Biotecnología, AMESCO) y se centrifugó nuevamente. Se lavó el botón celular con 1 mL de etanol al 70% (Grado Biotecnología, AMESCO). Se descartó la fase acuosa y se secó el botón celular durante 20 min (Speedvac, Thermo). Finalmente se resuspendió el DNA en 40 μ l de agua inyectable (GI). Se verificó el producto mediante electroforesis.

6.13 Ligación de los productos

En un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) se incubaron el plásmido pGL3 y el DNA plasmídico durante toda la noche a 4°C en una proporción (1:3). Se utilizaron 3 µl de DNA plasmídico, la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen) y 1X de amortiguador en un volumen final de 20 µl.

6.14 Transformación de los productos de ligación

El volumen total de la ligación se llevó a 100 µl totales con agua inyectable (GI), ésta se adicionó a una alícuota de la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α , la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min y posteriormente se llevó a 42°C durante 1 min, posteriormente se mantuvo en hielo durante 3 min. Se adicionó 1 mL de medio enriquecido SOC (250 mM de KCl, 100 mM de MgCl₂, 2 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 20 mM de glucosa para un litro) y se incubó a 37°C en agitación durante hora y media. Finalmente se cultivo la mezcla en una placa de medio Luria-Bertani (LB) con 75 µg mL⁻¹ de ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C.

6.15 Identificación de las colonias transformadas

Las colonias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en LB con 75 µg mL⁻¹ de ampicilina. Las colonias resistentes al antibiótico ampicilina se sembraron en placas y se crecieron por separado en 5 mL de caldo LB durante 18 horas a 37°C en un agitador orbital (MCR Laboratory Equipment, USA), posteriormente se purificó el DNA plasmídico.

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

El DNA plasmídico se introdujo en ambas líneas celulares empleando 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 1000 ng 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. 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 (Promega).

6.17 Inmunocitoquímica

6.17.1 Purificación de células de sangre periférica

Se realizó mediante la técnica de separación por gradiente y centrifugación; empleando Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Sweden), en una relación 2:1 con respecto a la muestra de sangre. La separación se llevó a cabo en un tubo de 15 mL (Axygen®, USA) mediante centrifugación a 251.55 g por 25min. Posteriormente se colectó la fase intermedia que contenía las células mononucleares en un tubo de 2 mL (Eppendorf AG, Germany), se le adicionó PBS 1X (Phosphate buffered Saline, pH 7.2) y se centrifugó a 251.55 g durante 5 min. Finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de PBS 1X.

6.17.2 Preparación de laminillas

En un portaobjetos (Madesa Esmerilado, México) se colocaron 30 000 células divididas en tres puntos, posteriormente se fijaron en formalina al 4% durante 20 min a 4°C. Finalmente se secaron las laminillas a temperatura ambiente y se almacenaron hasta su posterior uso.

6.17.3 Inmunotinción

Se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio (pH 6.0, 0.01M) durante 20 min a 90°C en baño María (Thermo, USA). Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con una mezcla de metanol y peróxido de hidrógeno al 1% durante 15 min y enseguida se hizo el bloqueo con suero normal de cerdo al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se aplicó el anticuerpo primario dejándolo en incubación toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda y agitación (orbital Labnet, USA). Al día siguiente, las laminillas se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina por 30 min a temperatura ambiente, seguido de incubación con estreptavidina conjugada a HRP (Universal LSAB+ KIT/HRP, DAKO Cytomation), por último la tinción se favoreció mediante la adición del substrato cromógeno DAB. Se realizó la contra-tinción con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron bajo las siguientes condiciones: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xileno en tiempos de 5 min cada uno. Finalmente, las preparaciones se montaron con un cubreobjetos y resina. Las laminillas se observaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) utilizando un analizador de imágenes (Image-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD.USA).

6.18 Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism 4.0 y se aplicó la prueba estadística de ANOVA no paramétrico y prueba de Tukey para comparación entre grupos. Un valor < 0.5 fue considerado como significativo. Para los ensayos de correlación se utilizó un análisis de Pearson.

A8. RESULTADOS

7.1 Identificación de sitios para YY1 en el promotor de *mdr1*.

Para proponer que el factor de transcripción YY1 está regulando el promotor de *mdr1*, se realizó un estudio de TESS (Transcription Element Search System, www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess) en el cual se analizó la secuencia de nucleótidos del promotor de interés mediante un programa especializado que conjuga las bases de datos de TRANSFAC v6.0, JASPAR 20060301, IMD v1.1 y CBI/GibbsMat v1. Mediante este análisis se determinaron los sitios de unión hipotéticos a los diferentes factores de transcripción. En el **esquema 1A**, se muestran los 2000 pb que corresponden a la secuencia del promotor de *mdr1* en humano. Los rectángulos en color gris indican los 4 sitios de unión para YY1 ubicados en las posiciones -270, -1230, -1420 y -1860 con un factor (que refleja la afinidad de unión) de 12, 7.88, 8.49 y 12 respectivamente. El esquema también muestra sitios de unión para diferentes factores de transcripción como SP1 (-1850), AP-1 (-661), y NF- κ B (-150); la posición de la caja TATA (-25) y CAAT (-230). En el **esquema 1B** se muestra la secuencia del promotor CMV que se empleó como control positivo de funcionalidad del plásmido, así como sitios consenso para diversos factores de transcripción y el sitio de inicio de la transcripción.

Determinados los posibles sitios de unión para YY1 en *mdr1*, se evaluó si YY1 regula de manera transcripcional al gen *mdr1*, para ello se clonó el promotor de este gen en un plásmido reportero y posteriormente se analizó la actividad de la “proteína reportera”. En el **esquema 2** se muestra el plásmido reportero pGL3 utilizado para estos ensayos. pGL3 contiene el sitio de origen del plásmido pBR322, una región que le confiere resistencia a la ampicilina, un sitio de multiclonación que incluye 10 sitios de corte de diferentes enzimas de restricción que incluyen Kpn1, Xho1 y Hind III entre otras y la secuencia del gen que codifica para la proteína luciferasa que funciona como proteína reportera.

Finalmente, el panel superior del **esquema 3** representa la ubicación de los cuatro sitios de unión para YY1 en el promotor de *mdr1* y la estrategia planteada para evaluar la regulación transcripcional de dicho gen. En el panel inferior se muestran los plásmidos que contienen la secuencia completa del promotor de *mdr1* y la secuencia de *mdr1* con la delección de tres sitios para YY1 reportados en este trabajo.

7.2 Obtención del promotor de *mdr1* y citomegalovirus (CMV).

La secuencia promotora de *mdr1* se obtuvo mediante PCR para posteriormente realizar su clonación. En la sección de material y métodos se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la PCR, como templado se empleó DNA genómico obtenido de leucocitos purificados de sangre periférica humana. En la **figura 1** se muestra un gradiente de temperatura realizado con la finalidad de optimizar la obtención del promotor de *mdr1*. El gel de agarosa teñido con bromuro de etidio nos muestra que en el carril 3 correspondiente a la temperatura de 58.5°C es la temperatura óptima para obtener la banda de 2000 pb, aunque también se puede observar una banda muy tenue del peso deseado en el carril 4 (61.7°C).

Para demostrar que el producto obtenido mediante PCR de 2000 pb, corresponde a la secuencia del promotor de *mdr1* se realizó un análisis de restricción con la enzima Xho I, que se encuentra en la posición -1180 pb en la secuencia promotora de *mdr1*. La **figura 2** corresponde al gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, donde en el carril 2 se aprecia el producto de PCR de 2000 pb y en el carril 3 el producto de PCR digerido con Xho I que presenta como resultado un fragmento de 820 pb y otro de 1180 pb.

También se amplificó mediante PCR el promotor de CMV con la finalidad de utilizarlo como control positivo de funcionalidad del plásmido reportero. Los oligonucleótidos empleados para la obtención del promotor se muestran en material y métodos. En la **figura 3**, el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra en el carril 2 el producto esperado de 600 pb, en el carril 3 se aprecia la digestión con la enzima Nde I que corta en la posición -243 dando como resultado 2 bandas (243 y 357 pb).

Los resultados anteriores demuestran que los fragmentos amplificados corresponden a la secuencia del promotor de *mdr1* y la secuencia del promotor de CMV.

7.3 Clonación de las secuencias promotoras de *mdr1* y CMV en el plásmido pGL3.

Para demostrar la funcionalidad de las secuencias promotoras de *mdr1* y CMV, se realizó la clonación de estas secuencias en el plásmido reportero pGL3 (**esquema 2**). La **figura 4A** muestra en el carril 2 a pGL3 digerido con las enzimas Kpn I y Hind III, en el carril 3 muestra la secuencia del promotor de *mdr1* digerida con las mismas enzimas. La **figura 4B** muestra en el carril 2 a pGL3 digerido con las enzimas Nhe I y Xho I y en carril 3 la secuencia del promotor de CMV digerido con las mismas enzimas. Posterior a la digestión del plásmido y los fragmentos a clonar, se realizó una ligación con la enzima T4 DNA ligasa como se muestra en el panel superior de las **figuras 4A y 4B**.

Después de la ligación se realizó la transformación de las bacterias *E. coli* DH5- α en presencia de ampicilina con la finalidad de seleccionar las bacterias que tenían el plásmido pGL3 con el inserto (secuencia promotora). La **figura 5** muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se aprecian las colonias transformadas que se obtuvieron para el promotor de *mdr1*. Como se puede observar, las clonas 3, 10 y 12 muestran retardamiento al correr en el gel con respecto al plásmido pGL3. En el caso de las colonias transformadas para el promotor de CMV, el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que se muestra en la **figura 6**, permite observar que al menos la clonas 4, 6 y 10 presentan indicios de contener la secuencia deseada al correr retrasadas con respecto a pGL3.

Una vez seleccionadas las colonias transformadas, se verificó que hubieran insertado la secuencia promotora de interés, para esto se realizó un análisis de restricción de cada una de ellas.

La **figura 7** es una imagen representativa del ensayo de restricción que se realizó a las clonas 3, 10 y 12 que tentativamente contenían el inserto *mdr1*, el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra en el carril 2 el plásmido pGL3 sin digerir, en el carril 3 se aprecia a pGL3 digerido con la enzima de restricción KpnI, en el carril 4 se observa una clona sin digerir, en los siguientes carriles (5, 6 y 7) se presenta la digestión Hind III, la digestión Kpn I y la doble digestión de la misma clona respectivamente. La digestión de pGL3 con la enzima Kpn I da como resultado una banda de 4818 pb, mientras que la digestión sencilla de la clona que tentativamente contenía el inserto del promotor de *mdr1* con la enzima Kpn I o con la enzima Hind III presenta una banda lineal de 6818 pb. Al hacer una doble digestión de dicha clona con las enzimas Kpn I y Hind III, obtenemos dos bandas de 4818 pb y 2000 pb respectivamente.

Para el caso de CMV se realizó de igual manera un ensayo de restricción con el fin de determinar aquellas colonias que contuvieran la secuencia de interés. En la **figura 8** se presenta el ensayo de restricción realizado para las clonas 4, 6 y 10, en el carril 3 se observa la digestión del plásmido pGL3 con la enzima Xho I, en el carril 4 se muestra la digestión del mismo plásmido con la enzima Nde I. En el carril 6 se aprecia la digestión con la enzima Xho I de una clona que tentativamente contenía el inserto de CMV y finalmente el carril 7 corresponde a la misma clona digerida con la enzima Nde I. Se empleó la enzima Nde I, ya que se encuentra dentro de la secuencia del promotor de CMV y el sitio reconocido por la enzima de restricción Nhe I se perdió al realizar la clonación. Como se puede apreciar, la enzima Nde I no tiene efecto sobre el plásmido pGL3, mientras que para el caso de la clona que tentativamente contenía el inserto de CMV la digestión con la enzima Nde I da como resultado una banda de 5418 pb lo cual indica la presencia de un sitio Nde I el cual se encuentra en la secuencia para CMV.

Los resultados anteriores demuestran que las clonas obtenidas mediante la transformación de *E. coli* DH5 α contienen la secuencia promotora de *mdr1* y la secuencia promotora de CMV respectivamente.

7.4 Evaluación de la funcionalidad del promotor *mdr1* en líneas celulares PC3 y COS 7.

Para evaluar la funcionalidad del promotor de *mdr1* en el plásmido MDR1/pGL3, se realizaron ensayos de transfección en dos líneas celulares, PC3 y COS 7 como se describe en materiales y métodos. En la **figura 9A** se muestran las graficas de la línea celular PC3, donde se obtuvieron lecturas de aproximadamente 2000 unidades relativas de luciferasa (URL) para el control positivo CMV (CMV/pGL3), mientras que el promotor de interés *mdr1* (MDR1/pGL3) tienen valores de aproximadamente 1000 URL, para el control negativo pGL3 se obtuvieron valores de 500 URL. En el caso de las células COS 7 (**figura 9B**) los valores de CMV (CMV/pGL3) se aproximan a 6 300 URL y los valores de *mdr1* (MDR1/pGL3) se encuentran próximos a 6 000 URL, el control negativo pGL3 muestra valores de 100 URL. En ambos casos se puede apreciar que los valores de los controles mantienen diferencia significativa con respecto al promotor de *mdr1*.

Con base en los datos anteriormente expuestos, se confirmó la funcionalidad del promotor de *mdr1* en el plásmido MDR1/pGL3.

7.5 Evaluación de la importancia de los sitios de unión para YY1 en la secuencia promotora de *mdr1*.

El siguiente objetivo planteado era evaluar la importancia de los sitios de unión para YY1 en el promotor de *mdr1*. Para ello se eliminaron tres sitios de unión para YY1 en dicho promotor, correspondientes a -270, -1230 y -1420. La delección de los sitios se realizó mediante las enzimas de restricción Sma I y Xho I, que en conjunto cortan un fragmento de 1070 pb, donde están incluidos los sitios de unión ya mencionados.

En la **figura 10A**, el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio muestra en el carril 2 la doble digestión del plásmido MDR1/pGL3 con las enzimas Sma I y Xho I. Se aprecian dos bandas, una de 5748 pb y otra de 1070 pb.

En la **figura 10B** se aprecia el producto de 5748 pb de interés ya purificado y listo para clonarse. De esta manera se logró la delección de tres sitios de unión para YY1 en la secuencia promotora de *mdr1*.

Para demostrar la actividad del promotor de *mdr1* sin los sitios para YY1 correspondientes a -270, -1230 y -1420, fue necesario comprobar la obtención del plásmido M(-3). La **figura 11** muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en los carriles 4, 5, 7, 8 y 9 se muestra el ensayo de restricción con la enzima Sma I realizado para las colonias obtenidas después de la transformación de las bacterias *E. coli* DH5 α en presencia de ampicilina. Como se puede observar, las clonas 4, 8 y 9 muestran diferencia de tamaño al correr en el gel con respecto al plásmido completo MDR1/pGL3 equivalente a 6818 pb.

Una vez seleccionadas las clonas que tentativamente contenían la secuencia del promotor *mdr1* menos tres sitios de unión para YY1 denominada M(-3), se verificó que contuvieran la secuencia promotora de interés, para esto se realizó un ensayo de restricción de cada una de ellas. En la **figura 12** se observa el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en los carriles 5, 7, 8 y 9 se aprecia el producto de la doble digestión con las enzimas Kpn I y Hind III para las clonas que tentativamente contenían la secuencia de interés. Se observan dos bandas, una de 5748 pb y otra de 1070 pb respectivamente.

Los resultados anteriores demuestran que las clonas obtenidas mediante la transformación de *E. coli* DH5 α corresponden al plásmido M(-3) que contienen al promotor de *mdr1* con la delección de tres sitios para YY1.

Finalmente, para evaluar la importancia de los sitios de unión para YY1 en el promotor de *mdr1*, se realizó la transfección en las líneas celulares PC3 y COS 7 con el plásmido MDR1/pGL3 que contiene el promotor completo de *mdr1* y con el plásmido M(-3) que tiene el promotor de *mdr1* menos tres sitios de unión para YY1, empleando como control positivo el plásmido CMV/pGL3. La transfección se realizó como se describe en materiales y métodos.

En la **figura 13A** 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 para YY1 presenta un valor de 180 URL, presentando diferencia estadísticamente significativa. En la **figura 13B**, 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 para YY1 (M(-3)) con una lectura de 350 URL.

De esta manera, se comprobó que los promotores de los diferentes plásmidos construidos, MDR1/pGL3 y M(-3), incluyendo el promotor de CMV (CMV/pGL3) empleado como control positivo; son funcionales y de manera aun más importante se concluye que los sitios YY1 que fueron deletados son requeridos para un óptimo funcionamiento del promotor *mdr1*, lo cual indica que YY1 podría estar regulando de manera transcripcional al gen *mdr1*.

7.6 Evaluación de la expresión de YY1 y gp-170 en pacientes con LLA.

Para corroborar la asociación entre YY1 y la gp-170, se evaluó la expresión de ambas proteínas en células leucémicas mediante inmunocitoquímica. Para ello se utilizaron CMN de sangre periférica de 13 pacientes con LLA sin tratamiento. En la **figura 14** se presenta una microfotografía representativa donde se observa elevada expresión de YY1 (**C**) y de gp-170 (**E**) en un paciente con LLA, comparado con un control sano (**B y D**). La expresión de YY1 se aprecia principalmente en el núcleo, mientras que la expresión de gp-170 se aprecia en el citoplasma. En la **figura 14A** se muestra el control IgG de especificidad. La **figura 15** muestra la gráfica de correlación entre la expresión de YY1 y gp-170, en donde se observa una correlación directamente proporcional ($r=0.924$ y $p=0.0001$).

Los resultados anteriores refuerzan los datos obtenidos mediante técnicas de biología molecular en donde se muestra que YY1 podría estar regulando de manera transcripcional la expresión de *mdr1*, lo cual también se refleja en la expresión de la proteína gp-170.

A9. DISCUSIÓN

Actualmente el cáncer infantil representa la segunda causa de muerte a nivel mundial (1). La organización Mundial de la Salud (OMS) indica que en México la incidencia de cáncer entre los 4 y 15 años de edad es de 122 casos nuevos/millón/año, a diferencia de EUA que presenta una incidencia de 148 casos nuevos/millón/año. Del total de neoplasias malignas que se presentan en edad pediátrica (2), aproximadamente el 35% corresponden a leucemias agudas. Entre ellas la LLA es la más frecuente (9).

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se atienden cada año alrededor de 100 casos nuevos de LLA, la cual afecta con mayor frecuencia al género masculino que al femenino (13). Las manifestaciones clínicas de la LLA son muy variables y dependen de la edad del paciente, del sitio de origen y del ritmo de crecimiento de las células leucémicas. A pesar de la frecuencia de esta enfermedad y del conocimiento de algunos factores ambientales implicados en el desarrollo de la misma, la etiología de esta neoplasia no está completamente elucidada (18).

El tratamiento de los pacientes con LLA está adaptado al riesgo del paciente, es decir; se administrará un tratamiento intensivo al paciente que tiene mayor riesgo de recaída al diagnóstico y no se dará un tratamiento excesivo al paciente de riesgo estándar. El tratamiento comprende tres fases: inducción, intensificación (consolidación) y mantenimiento. La duración global es de un mínimo de dos años (21).

Debido a los esfuerzos para desarrollar nuevos y mejores tratamientos se ha logrado incrementar un 16% la supervivencia global de pacientes pediátricos con LLA, pues mientras que en el periodo de 1983 – 1985 se reportó una supervivencia de 56%, en el periodo de 1992-1994 se logró un 70% de supervivencia. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se ha reportado que la sobrevida de pacientes con LLA actualmente se encuentra alrededor del 75 - 80% (3), lo cual es equiparable con la sobrevida alcanzada en países desarrollados.

A pesar del enorme avance en los tratamientos, el 25% de los pacientes con LLA desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos (7). Esto significa que sólo el 75% de los pacientes con esta enfermedad podrá lograr una recuperación total, el resto fallecerá por progresión de la neoplasia o como consecuencia de las complicaciones del tratamiento (22).

Uno de los mecanismos más estudiados que tienen que ver con la resistencia a la quimioterapia es el desarrollo del fenotipo MDR en células tumorales, que consiste en la disminución de los niveles intracelulares de los fármacos a través de transportadores de membrana específicos (31).

Los transportadores ABC (ATP binding cassette), utilizan energía de la hidrólisis del ATP para disminuir los niveles citoplasmáticos de sus sustratos y uno de sus representantes más estudiados es la proteína gp-170. Esta proteína es codificada por el gen *mdr1*, se expresa de manera constitutiva en tejido normal y su función fisiológica es la de una bomba de expulsión dependiente de ATP, la expresión de la gp-170 o el RNA mensajero de *mdr1* son frecuentemente detectados en tumores de pacientes con cáncer de ovario y próstata (35).

Por otro lado, se sabe que los mecanismos de transcripción involucrados en la inducción de gp-170 en células tumorales humanas son muy complejos. Diversos esfuerzos se han realizado para tratar de entender los mecanismos a través del cual los factores de transcripción regulan la expresión de esta proteína, sin embargo, poco se sabe acerca estos mecanismos de regulación (34).

Nuestro grupo de trabajo tiene amplia experiencia en el estudio del factor de transcripción YY1, este factor juega un papel fundamental en procesos biológicos normales como embriogénesis, diferenciación, replicación, proliferación celular y también se sabe que está implicado en diversos mecanismos de carcinogénesis (42). Estudios de nuestro grupo de trabajo en colaboración con la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA) USA, han demostrado que YY1 regula la transcripción del gen Fas uniéndose a la región

silenciadora de su promotor (48). Otros trabajos en líneas celulares de cáncer de próstata y de ovario demostraron que YY1 también regula la expresión de DR5, el cual es uno de los receptores para TRAIL (receptor de superficie celular participante en la vía extrínseca de inducción de apoptosis), dichos estudios sugieren que YY1 es un mecanismo de resistencia a la apoptosis desarrollada por las células tumorales (48).

La existencia de algoritmos que ayudan a predecir si una secuencia promotora en particular tiene sitios consensos de unión a factores de transcripción específicos ha sido de gran utilidad. Empleando el programa TESS se determinó que el promotor del gen *mdr1* presenta cuatro sitios de unión para YY1 (**esquema 1**).

Por lo que se planteó que YY1 puede ser un factor que este regulando la transcripción de *mdr1* y por tanto la expresión de gp-170, lo cual puede vincularse con el desarrollo de quimioresistencia. Con base en lo anteriormente expuesto, se evaluó la participación del factor YY1 en la regulación transcripcional del gen *mdr1*, empleando un sistema de plásmidos reporteros.

Ésta metodología ha sido ampliamente utilizada para el análisis de la regulación de secuencias promotoras, Ningxi Z. y su equipo de trabajo determinaron la interacción del factor KLF5 y la proteína p53 en la regulación de la proteína survivina en leucemia linfoblástica aguda (29).

La clonación de promotores y delección de sitios de unión para un determinado factor de transcripción ha permitido elucidar los mecanismos involucrados el desarrollo de resistencia a agentes anti-neoplásicos. En 2009, Ni Chen reportó que HIF-1 α regula la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-xL, que se encuentra altamente expresada en diversos tipos de cáncer incluyendo cáncer de próstata (49).

En otro estudio reciente en donde también utilizaron la tecnología de plásmidos reporteros, se ha demostrado que la proteína Cap1p tiene la capacidad de activar al gen *mdr1* en *C. albicans*, sin embargo; en este estudio no analizaron de manera específica el gen *mdr1*, pues el estudio incluyó el análisis de 12 genes más, entre los que se encuentran FLU1 y YCF1, entre otros (50).

En este trabajo se reporta la construcción del plásmido MDR1/pGL3 (**figura 7**) que contiene la secuencia promotora del gen *mdr1* con los cuatro sitios de unión para YY1. El plásmido CMV/pGL3 (**figura 8**) que contiene el promotor de CMV y el plásmido M(-3) que corresponde al promotor del gen *mdr1* con tres sitios de unión para YY1 deletados (**figura 11**). Las secuencias promotoras fueron insertadas en el plásmido reportero pGL3 (**esquema 2**).

Las secuencias promotoras utilizadas para la construcción de estos plásmidos se obtuvieron a partir de DNA genómico purificado de CMN de sangre periférica mediante la técnica de PCR como se muestra en la **figura 2** carril 2 para la región promotora de *mdr1* y en la **figura 3** carril 2 para la región promotora de CMV respectivamente.

Para verificar que las secuencias obtenidas mediante PCR fueran las correspondientes a los promotores de *mdr1* y CMV se realizaron ensayos de restricción, en la **figura 2** carril 3 se muestra la digestión con la enzima Xho I para la secuencia promotora de *mdr1*, en la **figura 3** carril 3 se muestra la digestión con la enzima Nde I para la secuencia promotora de CMV. Con este análisis se comprobó la obtención de las secuencias de interés, sin embargo; es importante la secuenciación de estos fragmentos para demostrar al 100% que se trata de dichas secuencias y que no contienen algún tipo de mutación. Esto último es poco probable debido a que en la reacción de PCR se utilizó la enzima Pfx que tiene actividad reparadora.

Por otro lado se evaluó la funcionalidad de los promotores ya mencionados mediante ensayos de transfección en células tumorales PC3 y COS 7, para el caso de las células PC3 se sabe que expresan el factor YY1 (45). En la **figura 9A** se muestran los

resultados de la transfección en la línea celular PC3, en la **figura 9B** se muestran los resultados de la transfección en la línea celular COS 7, se puede observar que la proteína luciferasa emite luz, cuya intensidad se puede medir como unidades relativas de luz (URL) en un luminómetro. El plásmido con la secuencia promotora de *mdr1* (MDR1/pGL3) emite aproximadamente dos veces más URL si se compara con el plásmido vacío para el caso de PC3. Para el caso de COS 7, el plásmido con la secuencia promotora de *mdr1* (MDR1/pGL3) emite aproximadamente 8 veces más URL si se compara con el plásmido vacío. Esto último, sugiere que COS 7 puede estar expresando una mayor cantidad de YY1 o puede tener mayor actividad en comparación con PC3.

De esta manera se comprobó la funcionalidad de las secuencias promotoras de CMV y de *mdr1*. Para evaluar de manera definitiva la importancia de los sitios de unión para YY1 en la secuencia promotora de *mdr1*, se procedió a hacer la delección de tres sitios de unión para YY1.

A partir de la construcción MDR1/pGL3 que contiene la secuencia del promotor completo de *mdr1* y una vez comprobada su funcionalidad, se obtuvo el plásmido M(-3) que contiene la secuencia del promotor de *mdr1* menos tres sitios de unión para YY1. Esto se logró mediante la digestión del plásmido MDR1/pGL3 con las enzimas de restricción Sma I y Xho I que en conjunto cortan una fracción de 1070 pb. En la **figura 10A** se pueden observar dos bandas de 5748 pb y de 1070 pb respectivamente, en esta última banda se encuentran los sitios consenso reconocidos por YY1 que se deseaban eliminar del plásmido MDR1/pGL3. En la **figura 10B** se aprecia la purificación de la secuencia de interés de 5748 pb que corresponde a la secuencia promotora de *mdr1* menos tres sitios de unión para YY1 o M(-3). Para verificar la obtención del plásmido M(-3) se realizaron ensayos de restricción, en la **figura 11** se muestra la digestión con las enzimas Kpn I y Hind III. Con este análisis se comprobó la obtención de la secuencia promotora de *mdr1* menos tres sitios de unión para YY1.

Finalmente se realizó la evaluación de este promotor nuevamente mediante ensayos de transfección en células tumorales PC3 y COS 7.

En la **figura 13A** se muestran los resultados de la transfección en la línea celular PC3, en la **figura 13B** se muestran los resultados de la transfección en la línea celular COS 7. Se puede observar que la proteína luciferasa empleada como proteína reportera, emite luz cuya intensidad podemos medir como URL en un luminómetro. Para el caso de la línea celular PC3, la actividad de la secuencia promotora de *mdr1* MDR1/pGL3 es tres veces mayor a la que se reporta para el promotor de *mdr1* con la delección de tres sitios para YY1 (M(-3)), mientras que para el caso de COS 7, la actividad del promotor de *mdr1* (MDR1/pGL3) presenta el doble del valor obtenido para el M(-3). Nuevamente se observa el comportamiento en el que COS 7 emite mayores URL que PC3, sugiriendo que COS 7 puede estar expresando YY1 y tener más actividad del mismo en comparación con PC3.

Con base en los resultados obtenidos, se demostró que la delección de tres sitios de unión para YY1 tiene un impacto directo en la funcionalidad del promotor del gen *mdr1*, esto sugiere que YY1 regula de manera transcripcional la expresión de gp-170.

Para corroborar estos datos, se analizó la expresión de YY1 y de la gp-170 en CMN purificadas de sangre periférica de pacientes con LLA mediante inmunocitoquímica. En la **figura 14**, se observa claramente que las células control (**figura 14 B y D**), obtenidas de sangre periférica de personas sanas, presentan una tinción menor con respecto a las células leucémicas (**figura 14 C y E**). Ambas se comparan con el control IgG de especificidad (**figura 14A**).

La correlación entre la expresión de YY1 y gp-170 se determinó mediante una prueba de Pearson con $p=0.02$ y $r=0.935$ como se muestra en la **figura 15**, confirmando la correlación existente entre ambas proteínas.

De esta manera se concluye que el factor de transcripción YY1 se encuentra fuertemente vinculado con la expresión de la gp-170 en CMN de pacientes con LLA.

A10. CONCLUSIONES

El factor de transcripción YY1 podría estar regulando de manera positiva la expresión de la gp-170, dado que la delección de tres sitios de unión para YY1 dentro de la secuencia promotora de *mdr1* tiene un impacto directo en la actividad del gen reportero que se utilizo.

La expresión de YY1 correlaciona directamente con la expresión de la gp-170 en CMN de pacientes pediátricos con LLA, indicando fuertemente que cuando existe una mayor expresión de YY1, también existe una mayor expresión de gp-170.

Se sugiere que el factor de transcripción YY1 regula de manera positiva la expresión de la gp-170 y en consecuencia que pueda estar involucrado con el desarrollo de resistencia a los agentes quimioterapéuticos en pacientes pediátricos con LLA.

Estos datos nos ayudan a comprender mejor los mecanismos moleculares imperantes en el desarrollo de resistencia a la quimioterapia en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA.

Es la primera vez que se relaciona directamente a este factor de transcripción con el gen *mdr1* en leucemia linfoblástica aguda y se sugiere su participación en el desarrollo de resistencia a fármacos.

A11. PERSPECTIVAS

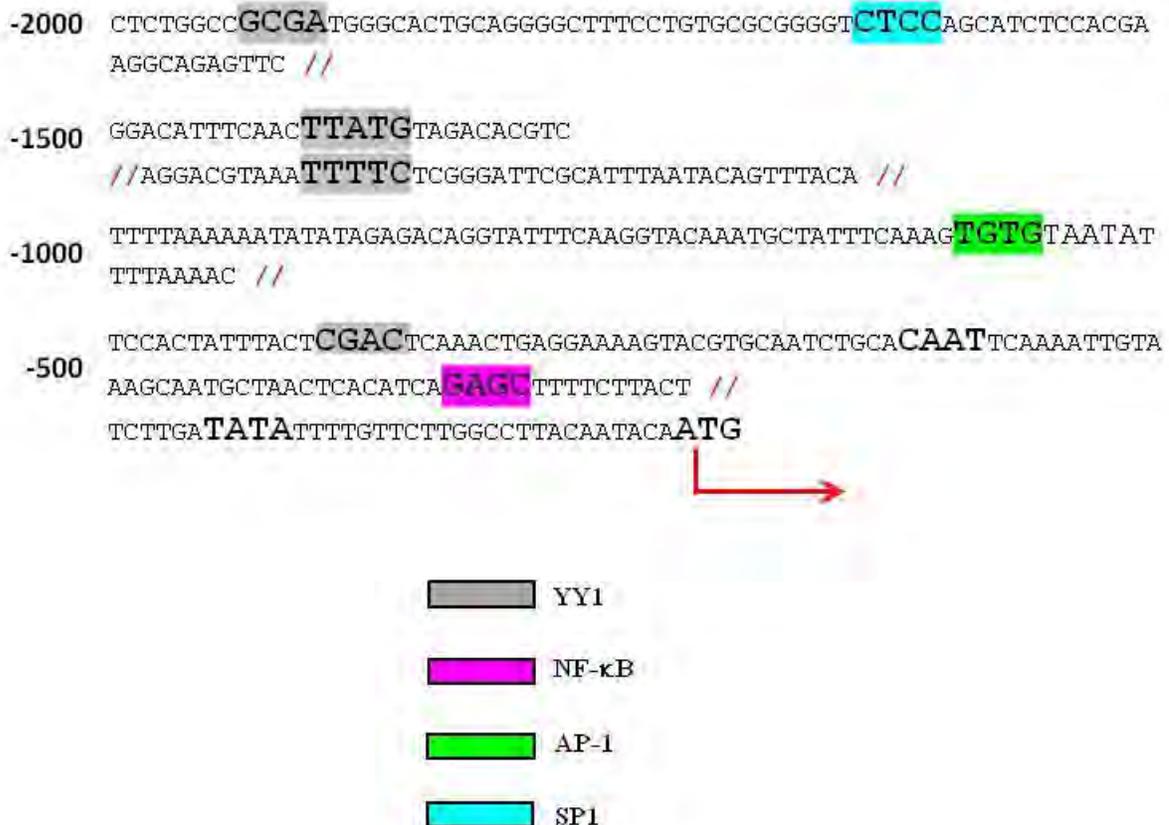
Es necesario realizar estudios complementarios como son inmunoprecipitación de la cromatina, ensayos con RNA de interferencia e indudablemente realizar la delección de los sitios de unión para YY1 que complete el esquema del promotor de *mdr1* menos 1, menos 2 y menos 4 sitios de unión para YY1.

Una vez obtenida la información necesaria, el factor de transcripción YY1 y la gp-170 podrían emplearse a futuro como biomarcadores e incluso como blancos terapéuticos.

Cuando se tenga toda esta información consideramos será de gran importancia, pues constituirá una herramienta útil para mejorar los esquemas de tratamiento contra la LLA, con la finalidad de conseguir un aumento en la sobrevida de los pacientes y una mejor calidad de vida.

A12. FIGURAS

Mapa del promotor del gen *mdr1* en humano



Esquema 1A. La secuencia del promotor del gen *mdr1* contiene secuencias de unión para diversos factores de transcripción, en el caso de YY1 se encontraron cuatro sitios de unión mediante un análisis de TESS en la posición -270, -1230, -1420 y 1860 con un factor (que denota afinidad) de 12, 7.88, 8.49 y 12 respectivamente. El factor de transcripción YY1 se asocia con algunos tipos de cáncer agresivos como el de mama y el de ovario. También se señalan en el esquema algunos otros sitios unión para factores de transcripción importantes como NF-κB en la posición -150, AP-1 en -661 y SP1 en la -1850 con factor de 20, 16 y 18 respectivamente. En el esquema también se muestran los elementos importantes en el promotor de MDR1, el sitio de inicio (ATG), la caja TATA y la caja CAAT implicados en la regulación de la transcripción.

Mapa del promotor del gen de CMV

-600 TAGTTATTAATAAGTAATCAATTACGGGGTTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGG
CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA

-300 TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG
GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTAC ATCTACG

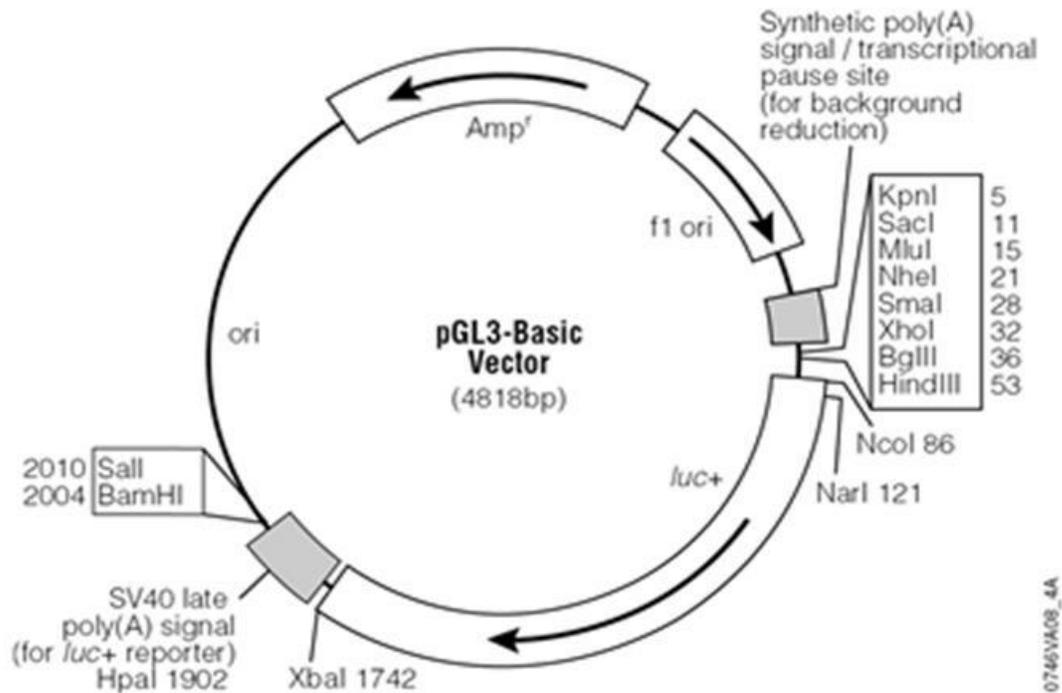
TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG
GATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGA
GTTTGTTTTGGCACCAAATCAACG //AACTCCGCCCCATTGACGCAAATG



 NF- κ B
 AP-1
 SP1

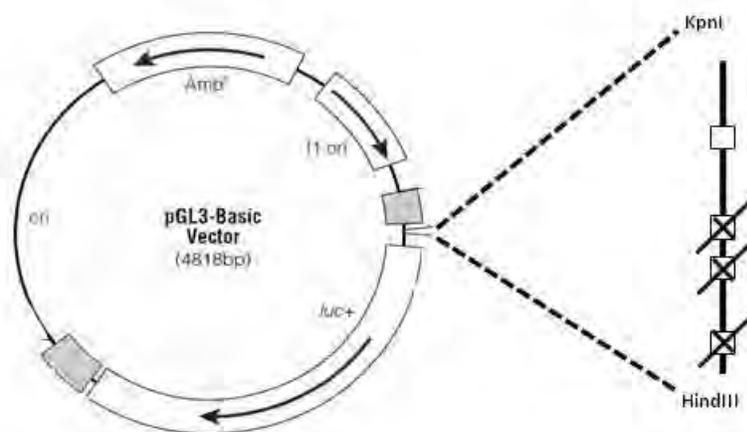
Esquema 1B. La secuencia del promotor del gen CMV contiene secuencias de unión para diversos factores de transcripción como NF- κ B en la posición -60, AP1 en la -300 y SP1 en la -80, con un factor de 15.57, 11.92 y 12 respectivamente. Este promotor se empleó como control positivo de funcionalidad para el plásmido MDR1/pGL3 y M(-3) del presente trabajo.

Mapa del plásmido reportero pGL3

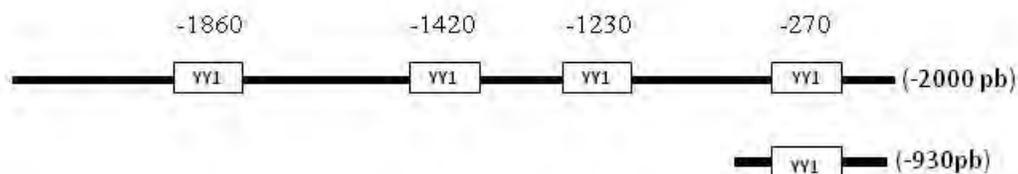


Esquema 2. pGL3 contiene el sitio de origen del plásmido pBR322, una secuencia que le confiere resistencia a la ampicilina, un sitio de multiclonación que incluye 10 sitios de corte de diferentes enzimas de restricción (KpnI, SacI, MluI, NheI, SmaI, XhoI, BglII, HindIII) y la secuencia del gen que codifica para la proteína luciferasa que funciona como proteína reportera. Tiene un tamaño de 4818 pb y ha sido diseñado para la clonación de secuencias promotoras de genes de interés.

Estrategia de delección de los sitios de unión para YY1 en el promotor del gen *mdr1*



PROMOTOR MDR1



Esquema 3. El promotor de *mdr1* tiene cuatro sitios de unión para el factor de transcripción YY1, para evaluar si YY1 está implicado en la regulación del promotor del gen *mdr1*; originalmente se planteó la estrategia utilizando un sistema de plásmidos reporteros que incluye el promotor completo de *mdr1*, que es la siguiente: el promotor de *mdr1* sin el sitio YY1 - 1860, otra mutación sin el sitio YY1 - 1420, otra construcción sin el sitio YY1 -1234, y una más sin el sitio YY1 -270. En el esquema se muestran únicamente las construcciones reportadas en este trabajo en la que utilizamos delección de tres sitios YY1 (-1860, -1420 y -1230) mediante ensayos de restricción.

Optimización de la técnica de amplificación para el promotor de *mdr1*

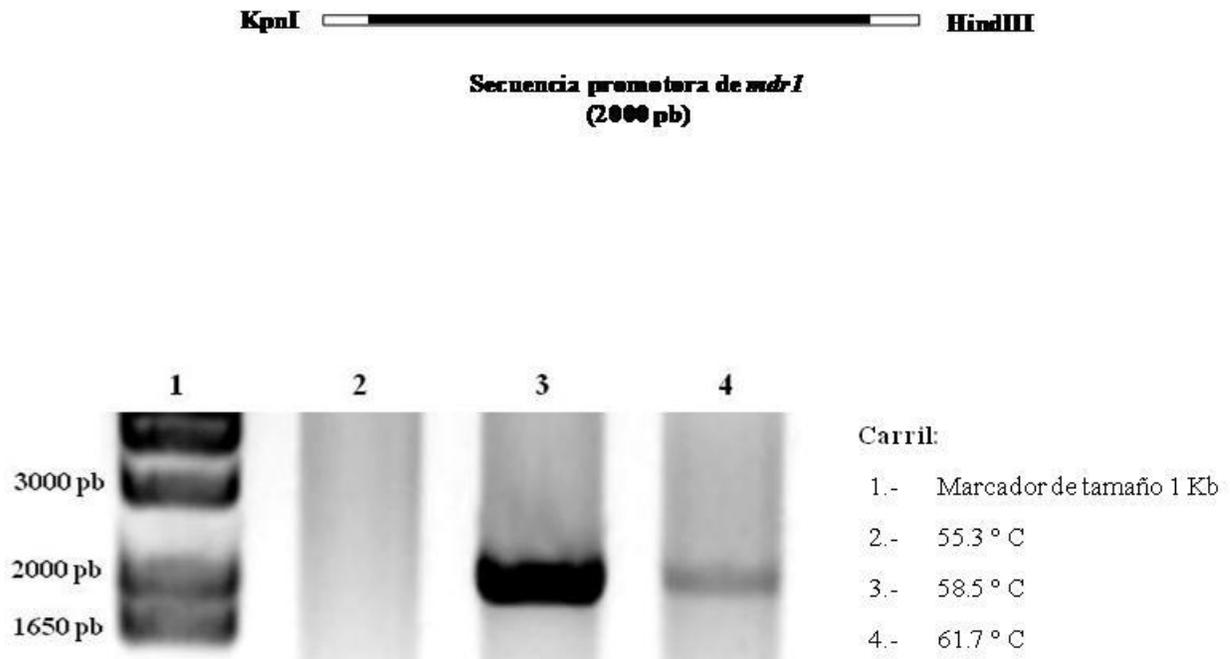


Figura 1. Gradiente de temperatura para la obtención de la secuencia del promotor de *mdr1*. Se empleó como templado DNA genómico obtenido a partir de leucocitos purificados de sangre periférica humana a una concentración de 1000 ng, en la mezcla de reacción también se utilizó 20 pmol de oligonucleótidos, 1X de amortiguador, 1U de enzima Pfx DNA polimerasa, 25 mM de MgCl₂ y 10mM de dNTPs. La reacción se llevó a un volumen final de 25 µl y se sometió a 35 ciclos de desnaturalización (92°C), de polimerización (gradiente) y amplificación (72°C), en un equipo termociclador con gradiente de temperatura (Eppendorf AG, Germany). Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

Verificación de la secuencia del promotor de *mdr1*

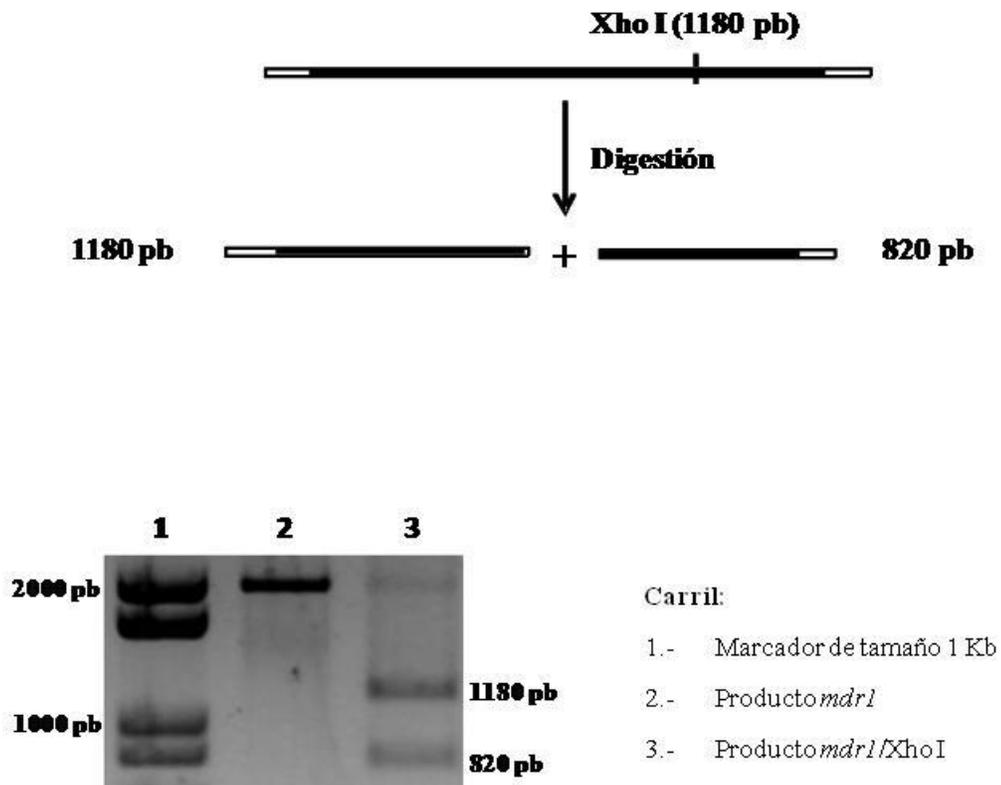


Figura 2. Ensayo de restricción del producto *mdr1* de PCR con la enzima Xho I. En la mezcla de reacción se emplearon 1000 ng del producto de PCR, 1X de amortiguador, 1U de enzima Xho I y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 25 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente la digestión de producto (2000pb) se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

Obtención y verificación de la secuencia del promotor de CMV

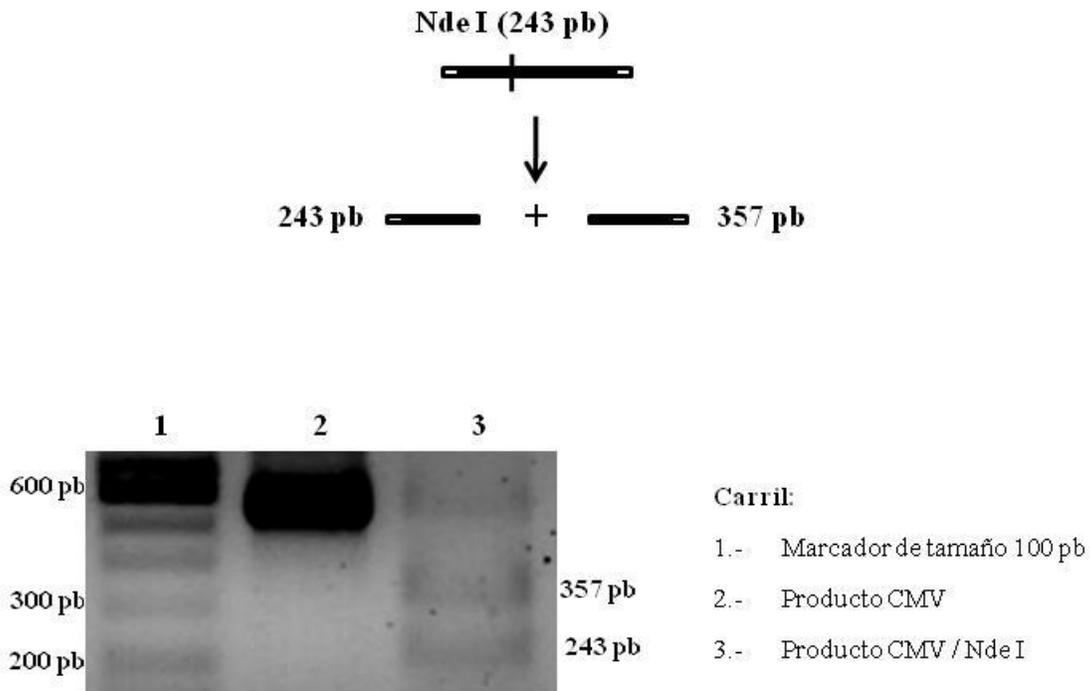


Figura 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de la secuencia del promotor CMV. En la mezcla de reacción se emplearon 1000 ng de DNA molde obtenido a partir de linfocitos de sangre periférica, 25 mM de MgCl₂, 1X de Buffer y 1U de enzima Polimerasa Pfx. La reacción se llevó a un volumen final de 25 µl, con 35 ciclos de desnaturalización (94°C), polimerización (57°C) y amplificación (72°C). **Verificación del producto obtenido mediante PCR.** Para la digestión con la enzima Nde I se emplearon 1000 ng del producto de PCR, 1X de amortiguador, 1U de enzima Nde I. La reacción se llevó a un volumen final de 25 µl y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. El producto de PCR y la digestión se verificaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. Las imágenes fueron fotodocumentadas con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

Preparación de insertos y del plásmido reportero pGL3 para la clonación

A)

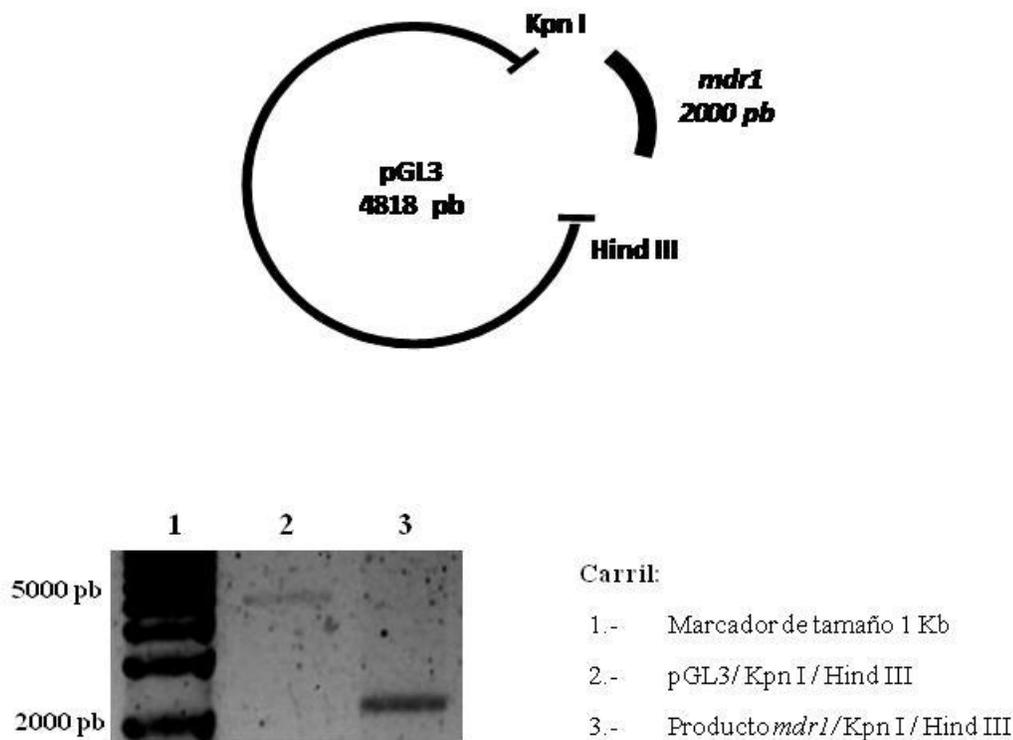


Figura 4A. Digestión del producto *mdr1* y del plásmido reportero pGL3. Para tener compatibilidad entre el plásmido reportero y el inserto se realizaron digestiones dobles. Para *mdr1* y el plásmido reportero, se emplearon las enzimas Kpn I y Hind III. De manera general se utilizaron 1000 ng del producto de PCR, 1X de Buffer, 1U de enzima Xho I y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 25 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

Adaptación de insertos y del plásmido reportero pGL3

B)

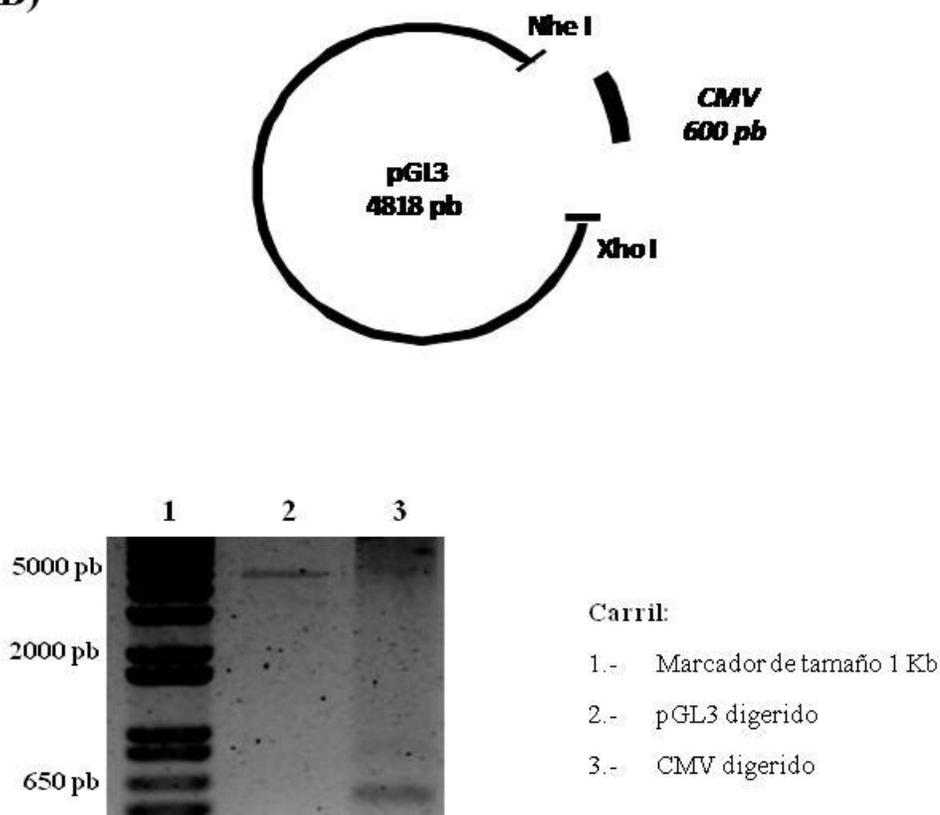


Figura 4B. Digestión del producto CMV y del plásmido reportero pGL3. Para tener compatibilidad entre el plásmido reportero y el inserto se hicieron dobles digestiones. Para el caso de CMV y su plásmido reportero se emplearon las enzimas Nhe I y Xho I. De manera general se utilizaron 1000 ng del producto de PCR, 1X de Buffer, 1U de enzima Xho I y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 25 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente el producto (600pb) se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

Análisis de restricción del plásmido MDR1/pGL3

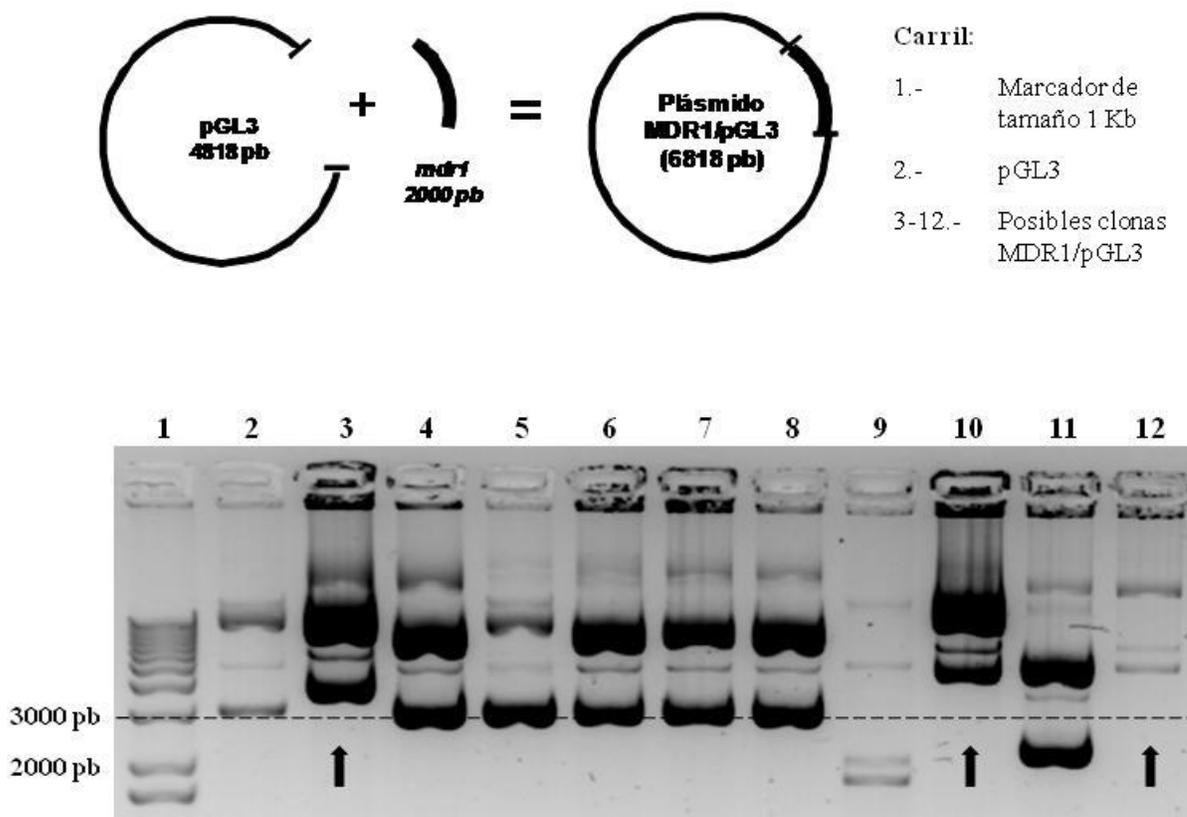


Figura 5. Purificación de las colonias transformadas para el plásmido MDR1/pGL3. Las colonias se purificaron mediante el Pure Link Hipure Plasmid Miniprep Kit marca Invitrogen Corporation, USA. Los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 1 min a 16 338 g, al botón celular se le adicionaron 200 µl de Buffer P1, P2 y P3 respectivamente. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. Se agregaron 600 µl de isopropanol frío, nuevamente se centrifugó y se lavó el botón celular con 1 ml de etanol al 70%. Se descartó la fase acuosa y se secó el botón durante 20 minutos al vacío (Speedvac, Thermo). Finalmente se resuspendió el DNA en 40 µL de agua inyectable. El producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0). Las flechas indican las clonas que probablemente contengan la secuencia promotora de *mdr1*.

Análisis de restricción del plásmido CMV/pGL3

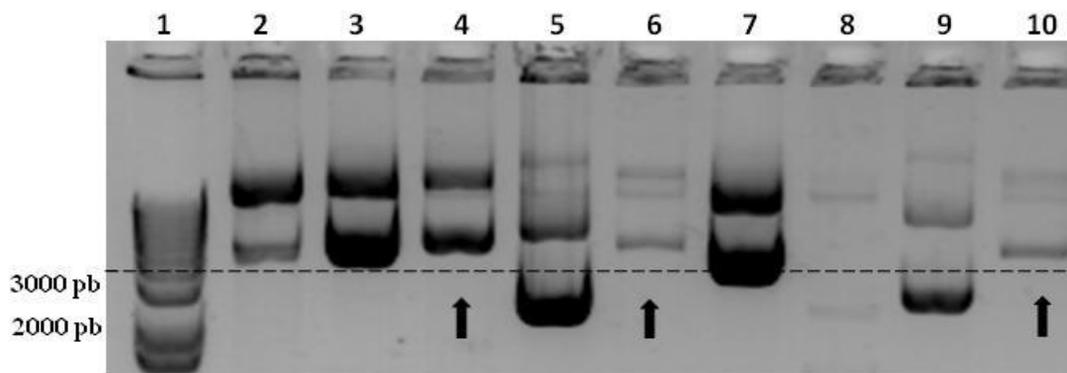
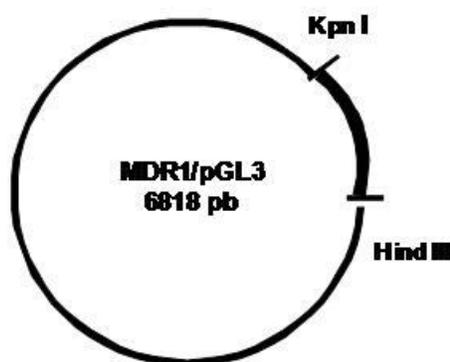


Figura 6. Purificación de las colonias transformadas para el plásmido CMV/pGL3. Las colonias se purificaron mediante el Pure Link HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen Corporation, USA). El cultivo se centrifugó durante 1 min a 15 338 g, al botón celular se le adicionaron 200 μ l de Buffer P1, P2 y P3 respectivamente. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. Se agregaron 600 μ l de isopropanol frío, nuevamente se centrifugó y se lavó el botón celular con 1 ml de etanol al 70%. Se descartó la fase acuosa y se secó el botón durante 20 minutos al vacío (Speedvac, Thermo). Finalmente se resuspendió el DNA en 40 μ L de agua inyectable. El producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0). Las flechas indican las clones que probablemente contengan la secuencia promotora de CMV.

Verificación de la obtención del plásmido MDR1/pGL3



Carril:

- 1.- Marcador de tamaño 1 Kb
- 2.- pGL3
- 3.- pGL3 digerido
- 4.- Clona MDR1/pGL3
- 5.- Clona / Kpn I
- 6.- Clona / Hind III
- 7.- Clona / Kpn I / Hind III

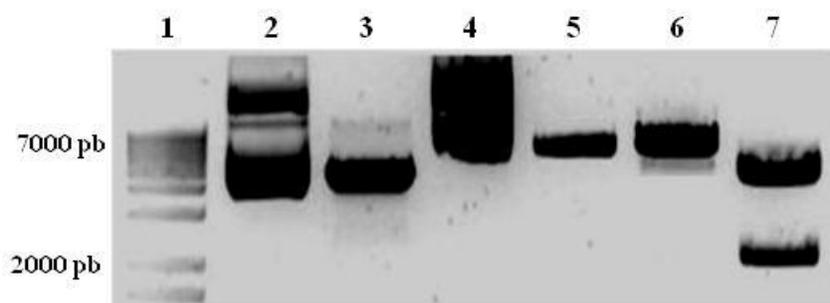


Figura 7. Ensayo de restricción de las clonas MDR1/pGL3. Se realizó una digestión sencilla del plásmido reportero, para las clonas se emplearon tanto digestiones sencillas como doble digestión con las enzimas Kpn I y Hind III. De manera general se emplearon 100 ng de DNA plasmídico, 1X de Buffer, 1U de enzima Xho I y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 15 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0). Se obtuvieron dos bandas esperadas, una de 4818 y otra de 2000 pb respectivamente.

Verificación de la obtención del plásmido CMV/pGL3

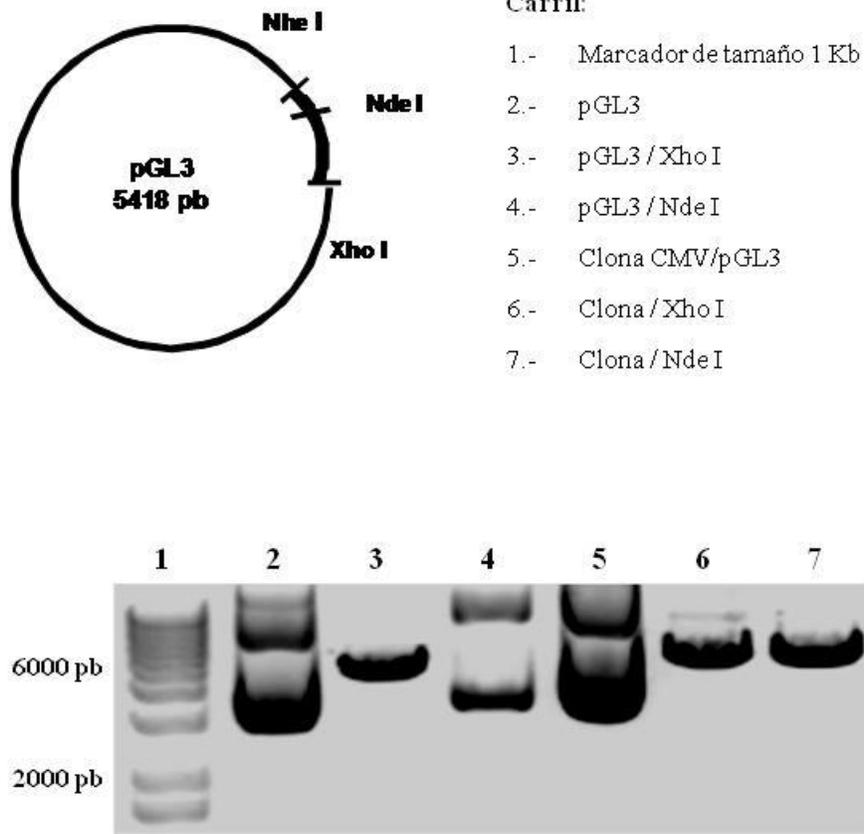
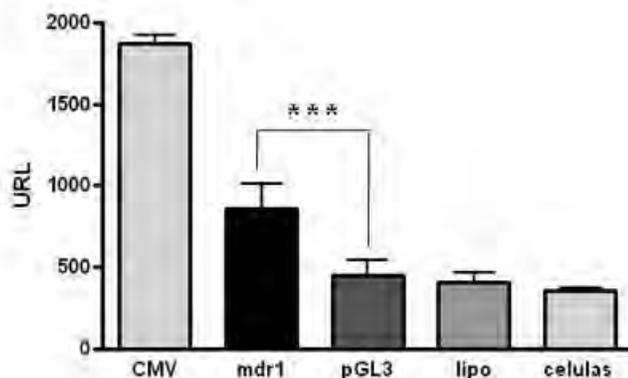


Figura 8. Ensayo de restricción de las clonas CMV/pGL3. Se empleó digestión sencilla tanto del plásmido reportero como de las clonas con las enzimas Xho I y Nde I, ésta última se encuentra dentro de la secuencia del promotor de CMV y se utilizó debido a que el sitio reconocido por Nhe I se perdió cuando se realizó la ligación del plásmido reportero con el inserto. De manera general se emplearon 1000 ng de DNA plasmídico, 1X de Buffer, 1U de enzima Xho I y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 15 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0). Se obtuvieron el producto linealizado a 5418 pb.

Evaluación de la funcionalidad del plásmido MDR1/pGL3

A) PC3



B) COS 7

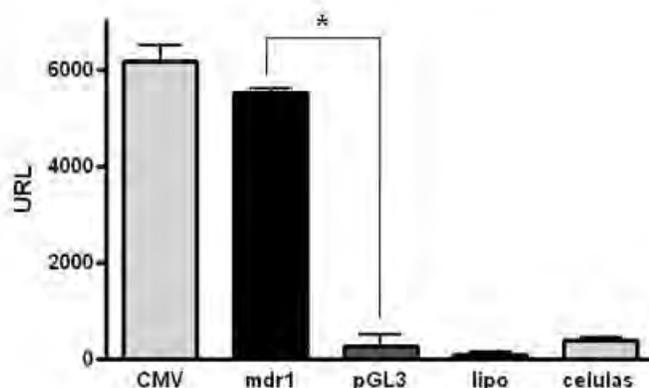


Figura 9. Ensayo de transfección con los plásmidos MDR1/pGL3 y CMV/pGL3. En una placa de 24 pozos se mantuvieron en cultivo 2×10^5 células/pozo toda la noche a 37°C y 5% de CO_2 . Al día siguiente se transfectó cada línea celular con 1000 ng de DNA plasmidico y lipofectamina 2000, se dejó en incubación durante 4 horas con esta mezcla, posteriormente se retiró la mezcla y 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 μl de Buffer de Lisis a cada pozo, se mantuvieron en agitación suave 15 minutos y se colectó el sobrenadante. Se tomaron 20 μl del lisado y se adicionaron 100 μl de sustrato en 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%. * $p = 0.001$ *mdr1* vs pGL3 en PC3 y *** $p = 0.05$ *mdr1* vs pGL3 en COS7.

Deleción de 3 sitios de unión de YY1 en el promotor de *mdr1*

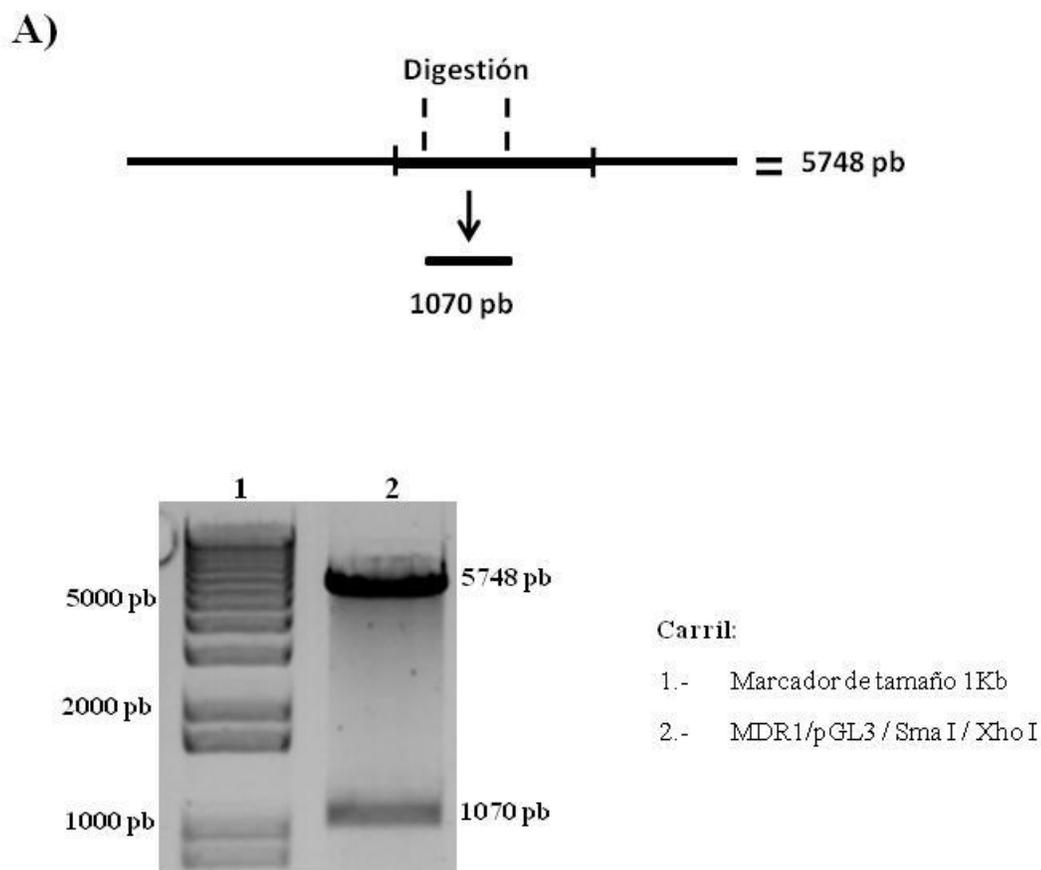


Figura 10A. Digestión del plásmido MDR1/pGL3 con enzimas de restricción Sma I y Xho I dentro de la secuencia del promotor de *mdr1* para deletar tres sitios de unión para YY1. Se hizo una digestión doble del plásmido completo MDR1/pGL3 con las enzimas Sma I y Xho I. De manera general se emplearon 10 000 ng de DNA plasmídico, 1X de Buffer, 1U de cada enzima y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 100 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumento con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

Deleción de 3 sitios de unión de YY1 en el promotor de *mdr1*

B)

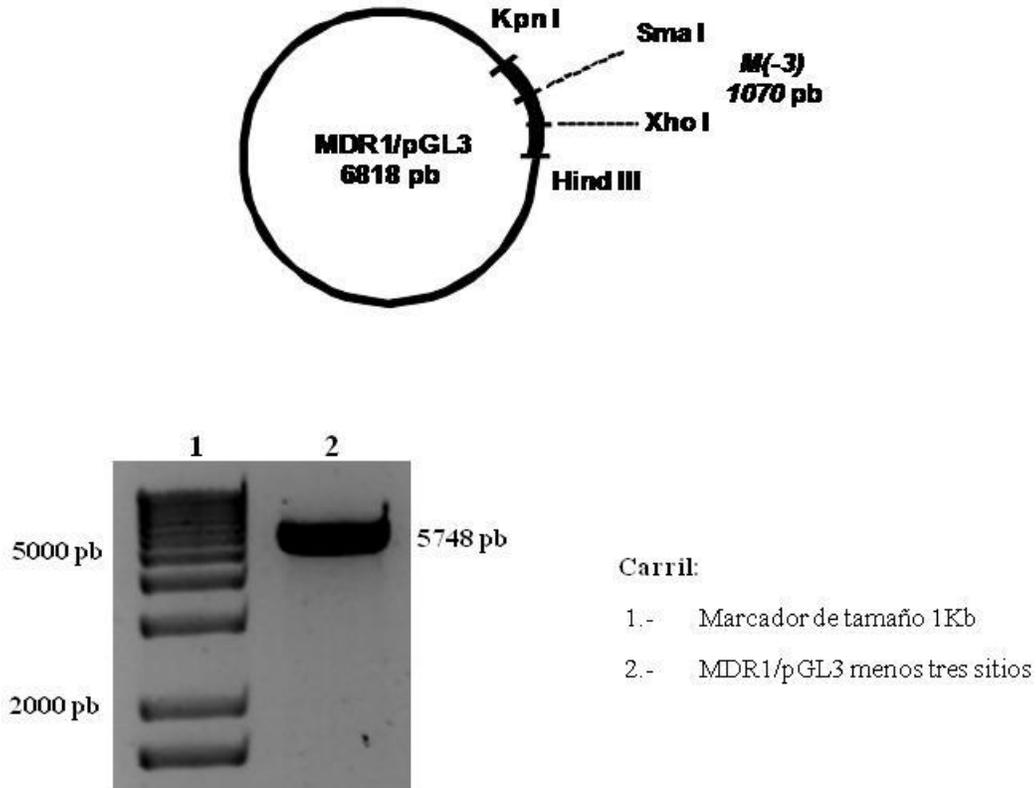


Figura 10B. Purificación de la secuencia de interés (5748 pb). El fragmento de interés se purificó mediante el Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen Corporation, USA). Según especificaciones del fabricante se agregaron 600 μ l de de reactivo de solubilización, incubándose a 50°C hasta que la agarosa se disolvió. Se pasó la muestra por la columna de purificación, centrifugando a 11 269 g durante 1 min. Se adicionaron 600 μ l de buffer de lavado, incubando 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente. Para obtener el DNA se agregaron 50 μ l de agua inyectable y se colectaron en un tubo de 1.5 ml nuevo mediante centrifugación. Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumento con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0).

Análisis de restricción del plásmido M(-3)

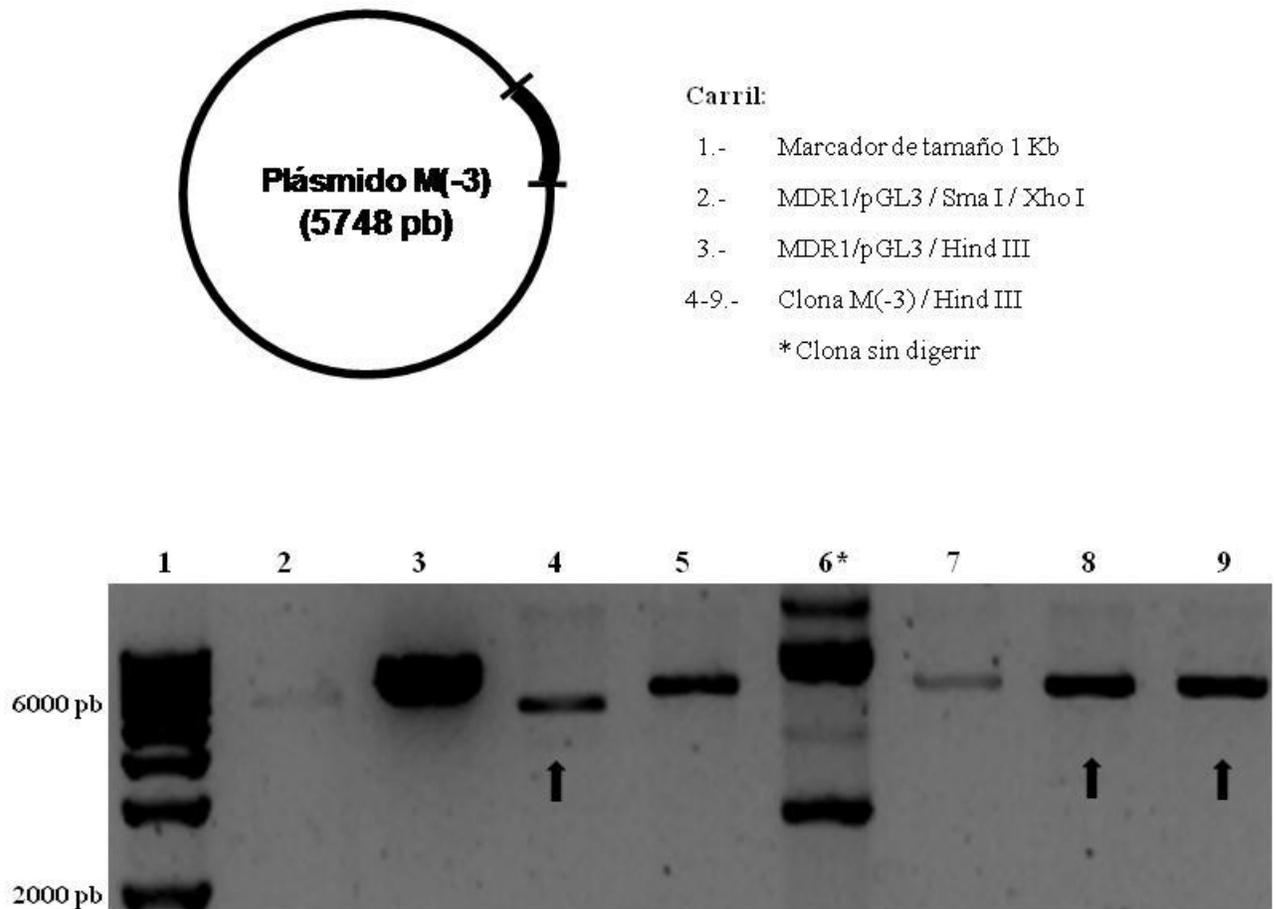


Figura 11. Ensayo de restricción de clonas M(-3). Se hizo una digestión sencilla del plásmido MDR1/pGL3 y de las colonias obtenidas, con las enzimas Sma I, Xho I o Hind III. De manera general se emplearon 10 ng de DNA plasmídico, 1X de Buffer, 1U de enzima Xho I y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 15 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumentó con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0). Las flechas indican las clonas que probablemente tienen la secuencia promotora de *mdr1* con la delección de tres sitios de unión para YY1.

Verificación de la obtención del plásmido M(-3)

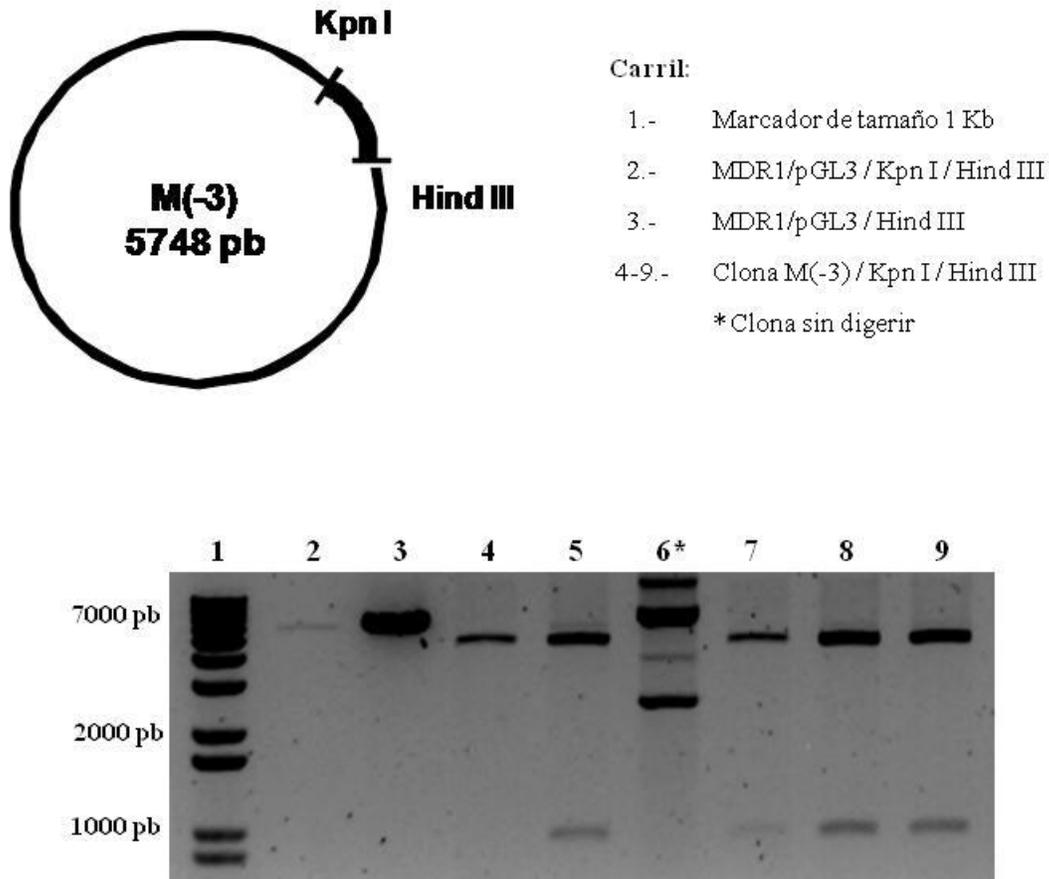
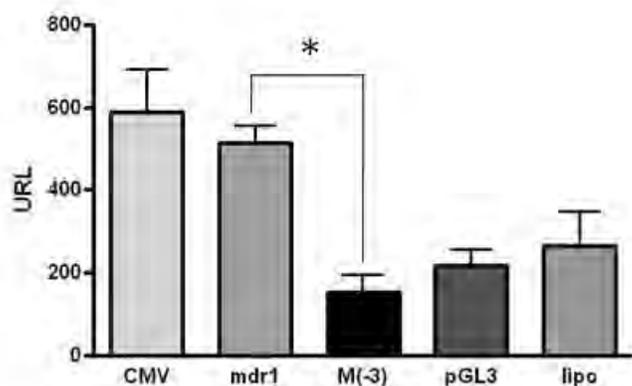


Figura 12. Ensayo de restricción comprobatorio de la obtención del plásmido M(-3). Se hizo doble digestión con las enzimas Sma I y Xho I para las probables clonas. De manera general se emplearon 1000 ng de DNA plasmídico, 1X de Buffer, 1U de enzima Xho I y BSA. La reacción se llevó a un volumen final de 15 μ l y se mantuvo a 37°C durante 2 horas. Finalmente el producto se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó bajo un transiluminador de luz UV. La imagen se fotodocumento con un analizador de imágenes (Bio-Imaging Systems, MiniBio Pro 2.0). Se obtuvieron dos bandas esperadas de 5748 pb y 1070 pb respectivamente.

YY1 participa en la regulación del promotor del gen *mdr1*

A) PC3



B) COS 7

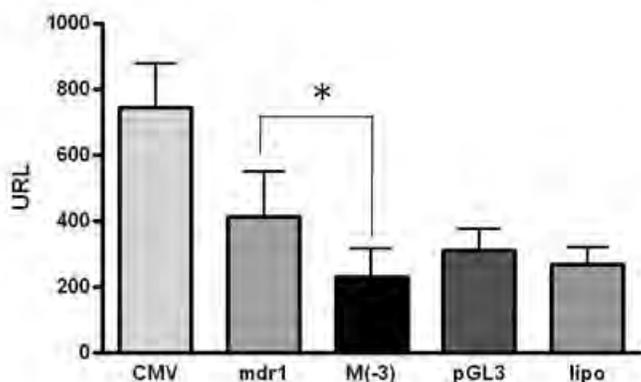


Figura 13. Ensayo de transfección final con los plásmidos MDR1/pGL3, M(-3) y CMV/pGL3. En una placa de 24 pozos se mantuvieron en cultivo 2×10^5 células/pozo toda la noche a 37°C y 5% de CO_2 . Al día siguiente se transfectó cada línea celular con 1000 ng de DNA plasmidico y lipofectamina 2000, se dejó en incubación durante 4 horas con esta mezcla, posteriormente se retiró esta mezcla y 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 μl de Buffer de Lisis a cada pozo, se mantuvieron en agitación suave 15 minutos y se colectó el sobrenadante. Se tomaron 20 μl del lisado y se adicionaron 100 μl de sustrato 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%. * $p = 0.05$ mdr1 vs pGL3 en PC3 y * $p = 0.05$ mdr1 vs pGL3 en COS7.

Expresión de YY1 y gp-170 en pacientes con LLA

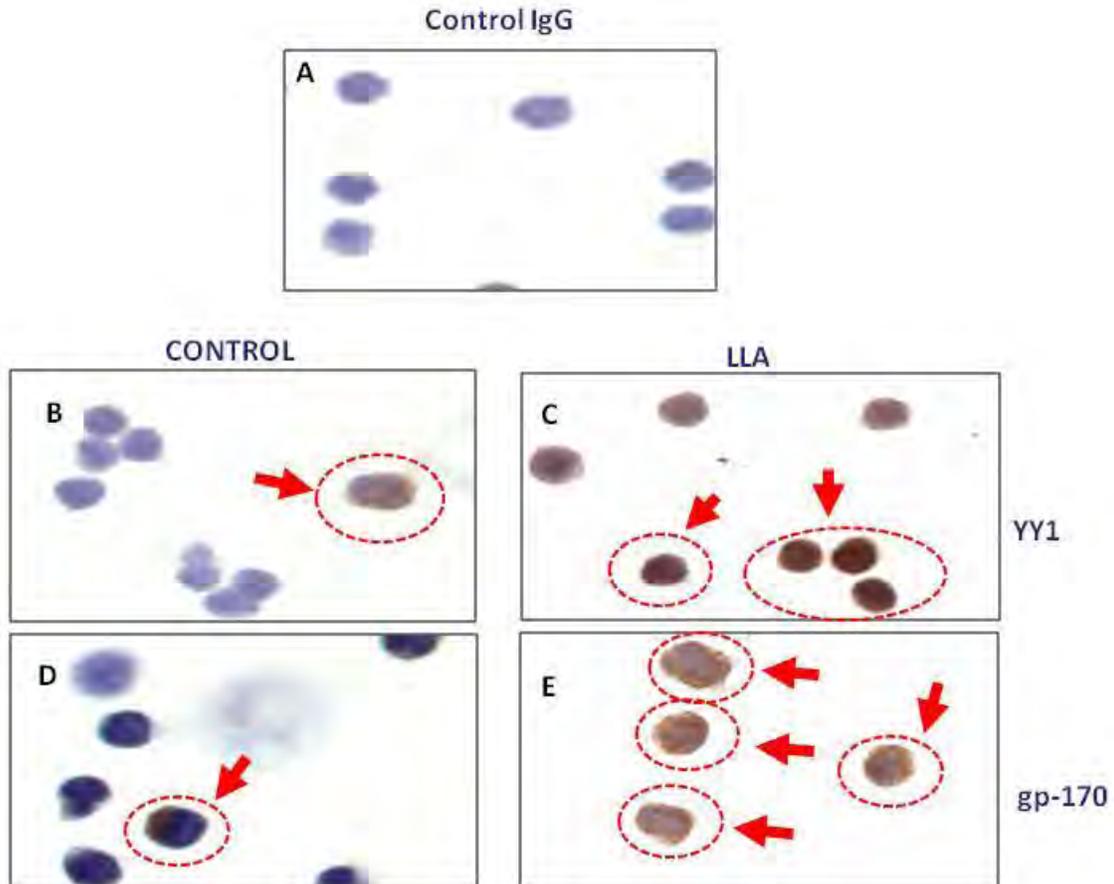


Figura 14. Microfotografía representativa de la expresión de YY1 y gp-170 en CMN. Los controles sanos, muestran menor expresión de YY1 y gp-170 (B)(D) con respecto a las CMN de pacientes diagnosticados con LLA (C y E). La tinción se presenta en el citoplasma de las células para el caso de gp-170 y en el núcleo en el caso de YY1(C) (E). El control de isotipo se muestra negativo, (A). Magnificación 100X.

Correlación positiva entre YY1 y gp-170

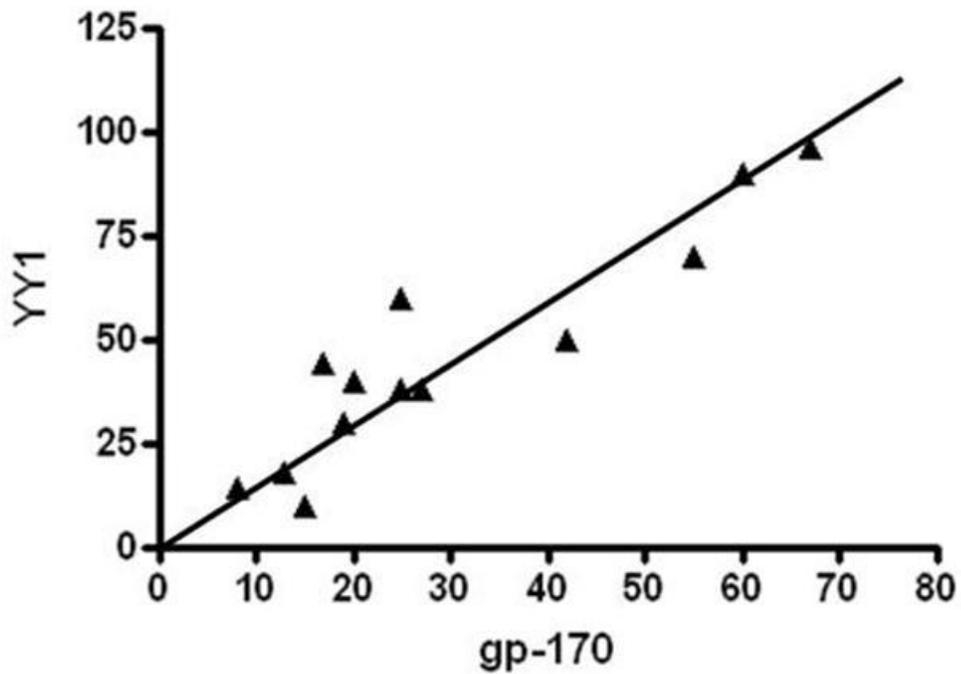


Figura 15. Análisis de correlación entre la expresión de YY1 y gp-170 . El porcentaje de la expresión de gp-170 en las células de los pacientes con LLA muestra una correlación directamente proporcional entre la expresión de YY1 y gp-170 ($r=0.924$, $p=0.0001$). Resultados calculados con la prueba de Pearson.

A13. REFERENCIAS

1. Rivera J, Oriol A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009. Vol. 23. No. 5:1033-1042.
2. Organización Mundial de la Salud. 58ª Asamblea Mundial de la Salud: Prevención y Control del Cáncer. Informe de la secretaría. 2005.
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. González R, Rizo P, Días H. Registro de pacientes nuevos en el INP. *Acta Pediatr Mex.* 2005. No. 26:100.
5. Rendón M, Ramos C, Bernárdez I, Iglesias J. Epidemiología del cáncer en niños y adolescentes con atención médica privada (1995-2004). *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2008. Vol. 46. No. 4:353-360.
6. Bistrain C, Villagómez P. La situación demográfica de México 2008. *Public Consejo Nac Pob. México.* 2008.
7. Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. Publicaciones científicas, No 144 e Instituto Nacional del Cáncer. Citado en Diciembre 2009. Disponible en: <http://www.cancer.gov>
8. Luengo C, Ocqueteau M. Leucemias Agudas. *Temas de Medicina Interna.* Universidad Católica de Chile. 2001.
9. González A, Rizo P, Chico P, Serrano P, Sánchez F, Lucas M, Domínguez W, López M, Paz M. Mortalidad del cáncer en el Instituto Nacional de Pediatría como problema de salud pública. *Acta Pediatr Mex.* 2009. Vol. 30. No. 2:124-127.
10. Cuevas M, Villasís M, Fajardo A. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Pub Mex.* 2003. Vol.45. Suplemento 1.
11. Rivera R. Linfomas. *Oncología Médico Quirúrgica Pediátrica.* México. McGraw-Hill Interamericana. 2001. pp. 299.
12. Medina A, Martínez A, Gallegos S, Juárez L, González P, Perales A. Pediatric oncology at Hospital Infantil de México: fifty-five years of accomplishment. *Pediatr Hematol Oncol.* 2002. Vol. 19. No. 6:383-387.

13. Dirección General de Información en Salud. Estadísticas de salud en niños y adolescentes. México. 2004. Boletín Med Hosp Infant Mex. Report No. 4.
14. McNeil D, Cote T, Clegg L, Mauer A. Update of incidence and trends in pediatric malignancies: acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol. 2002. Vol. 39. No. 6:554-557.
15. Greenlee R, Murray T, Bolden S, Wingo P. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin. 2000. Vol. 50. No. 1:7-33.
16. Rivera Luna R. El niño con Cáncer, los padecimientos más comunes para el médico no especialista. Editores de Textos Mexicanos. 2007. pp. 42.
17. Mejía J, Fajardo A, Bernáldez R, Paredes R, Flores H, Martínez M. Incidencia de las leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. Salud Pública Mex. 2000. No. 42:431-437.
18. Surveillance, Epidemiology, and End Results [SEER] Program, 2000-2004. National Cancer Institute. 2007.
19. Lassaletta A. Leucemias, Leucemia Linfoblástica Aguda. Departamento de Hemato-Oncología Pediátrica. Hospital Universitario Niño Jesús. Madrid. Pediatr Integral. 2004. Vol. 8. No. 5:435-442.
20. Woessner S, Florensa L. Introducción al estudio de las leucemias agudas. Clasificación. descripción de las variedades. Formas especiales. Hematología Clínica. 2001. 4ª Ed.
21. Carroll W, Bhojwani D, Min D. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Hematology. Am Soc Hematol Educ Program. 2003. pp. 102-31.
22. Antonio J. Oncología: Leucemias Agudas. 2002. Vol. 21. No. 6:117-122.
23. Luque J, Herráez A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. 2001. Editorial Harcourt.
24. Padrón M, Díaz E, Romero A, Machuca C, Ponte A. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en Leishmania. VITAE. 2007. Vol. 8. No. 33.

25. Shin F, Tadao F, Hideo H, Junko F, Junichi K, Kuniaki M, Mitsuo K, Takeshi S. Quantitative analysis of a *MDR1* transcript for prediction of drug resistance in acute leukemia. *Clin Chemistry*. 2002. Vol. 48. No. 6:811-817.
26. Ruiz M, Souviron A, Martínez M. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *An Med Interna*. Madrid. 2002. No. 19:477-485.
27. Laura M, Vargas R, Daniel R. Resistencia a drogas en pacientes con cáncer de mama. Centro Regional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina. 2000.
28. Arbelbide J. Importancia pronóstica de la expresión de MDR-1 en la leucemia mieloblástica aguda. 2003. Vol. 63. No.4:277-282.
29. Ningxi Z, Lubing G, Harry W, Ceshi C, Jin T, Lily Y, Muxiang Z. KLF5 Interacts with p53 in Regulation Survivin Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Jour of Biol Chem*. 2006. Vol. 281. No. 21:14711-14718.
30. Gallegos C, Martínez A, Juárez V. Comparison of two chemotherapy regimens for the treatment of acute myeloid leukemia in Mexican children. *Blood*. 2001.
31. Maxwell N, Hokland P. Biology of Multiple Drug Resistance in Acute Leukemia. *Int J Hematol*. 2000. Vol. 72: 290-297.
32. Wilburn E, John O, Kathleen J, Helton J, Langston X, Shegjie W, Ching H. Prevalence of leukoencephalopathy in children treated for acute lymphoblastic leukemia with high-dose methotrexate. *Am J Neuroradiol*. 2005. Vol. 26: 1263-1269.
33. Miklos B, Edward J, Rodney J. Characterization of the Human MDR1 Gene. *The AAPS Journal*. 2005. Vol. 7. No. 1.
34. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000. Vol. 92:1295-1302.
35. Kitada S, Pedersen I, Schimmer A, Reed J. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2002. No. 21:3459-3474.
36. Fu J, Chen Z, Cen J, Ruan C. Expression of the human multidrug resistance gene *mdr1* in leukemic cells and its implications in studying P-glycoprotein antagonists. *Chinese Med J*. 2000. Vol. 113. No. 3:228-231.

37. Philip R. Oncología Clínica: enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. Saunders. 8ª Edición. 2003.
38. Jin S, Scotto K. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. Mol Cell Biol. 1998. Vol. 18. No. 7:4377-4384.
39. Le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, Wilson K, Röttgers S, Schrauder A, Rosemann A, Irving J, Stam R, Shultz L, Harbott J, Jürgens H, Schrappe M, Pieters R, Vormoor J. In childhood acute lymphoblastic leukemia, blast at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. Cancer cell. 2008. No. 14:47-58.
40. Comerford K, Wallace T, Karhausen J, Louis N, Montalto M, Colgan S. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. Cancer Res. 2002. Vol. 15. No.12:3387-3394.
41. Wang Q, Beck W. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. Cancer Res 1998 Dec 15;58(24):5762-9.
42. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. Oncogene. 2006. Vol. 23. No. 8:1125-1142.
43. 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.
44. Hongo F, Garban H, Huerta S, Vega M, Jazirehi A, Mizutani Y. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. Biochem Biophys Res Commun. 2005. Vol. 21. No. 336:692-701.
45. Seligson D, Horvath S, Huerta S, Hanna S, Garban H, Roberts A. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. Int J Oncol. 2005. Vol. 27. No. 1:131-141.
46. Garban H, 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. Vol. 167. No. 1:75-81.
47. Academia biomédica digital. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en *Leishmania*. 2007. No. 33.
48. Baritaki S, Huerta S, Sakai T, Spandidos D, Bonavida B. Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1. *Mol Cancer Ther.* 2007. Vol. 6. No. 4:1387-1399.
49. Ni C, Xueqin C, Rui H, Hao Z, Jing G, Wentong M, Yiping L, Fang Z. BCL-X1 is a target gene regulated by Hypoxia-inducible factor 1 α . *J of Biol Chemistry.* 2009. Vol. 284. No. 15:10004-10012.
50. Znaidi S, Barker K, Weber S, Alarco A, Liu T, Boucher G, Rogers D, Raymond M. Identification of the *Candida albicans* Cap1c regulon. *Eucaryotik Cell.* 2009. pp. 806-820.
51. Grönross E, Terentiev A, Punga T, Ericsson J. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. *PNAS.* 2004. Vol. 101. No. 33:12165-12170.
52. Chen-Yu W, Yuh-Jin L, Young-Sun L, Hsiu-Ming S, Yuh-Shan J, Winston C. YY1AP, A Novel Co-activator of YY1. 2004. Vol. 279, No. 17:17750–17755.
53. Moriuchi M, Moriuchi H, Margolis DM, Fauci AS. USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *The Jour of Immunol.* 2002. No. 162: 5986-5992.