



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE
NF-KB SOBRE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN YY1
USANDO COMO MODELO LA LÍNEA CELULAR RS4;11
DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON DOXORUBICINA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
P R E S E N T A

ROCIO HERNÁNDEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO AQUINO-JARQUIN

ASESOR INTERNO: BIOL. JOSE MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ
VÁZQUEZ.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aquino-Jarquin.

Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación, ética y bioseguridad del Hospital infantil de México Federico Gómez, con el número de proyecto (HIM/2011/055) y recibió financiamiento por parte de la fundación TERRY FOX para la investigación en cáncer.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Héctor y Amalia por ser mis mejores amigos, mis aliados, mi ejemplo a seguir, gracias por todo el apoyo que me han brindado en esta tesis y en mi vida. Detrás de este logro están ustedes.

A mis hermanas Alma y Mónica gracias por ser mis sigilosas guardianes y compañeras son las mejores hermanas.

A mi director de tesis Dr. Guillermo y a mi tutor interno Biol. Misael agradezco infinitamente todo su apoyo, por compartir desinteresadamente sus conocimientos, experiencia y consejos.

A mis queridos amigos que participaron haciendo de la convivencia y el trabajo una aventura muy divertida, muchas gracias por su apoyo y enseñanza: Belén, Gaby, Jesús, Efrén, Ignacio, Norma, Daniel, Erika y Erandi.

A Karla y Marco dos personas muy especiales a las cuales quiero y admiro mucho, que me han entregado su compañía, su amistad, su paciencia y su cariño, muchísimas gracias.

A ti Esteban que desde el inicio de la carrera fuiste mi inagotable apoyo en los momentos más difíciles, por tu infinita paciencia y por tu tierna compañía. Gracias por compartir mi vida y mis logros.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. El cáncer y la leucemia.....	3
2.2. Clasificación de la leucemia.....	4
2.3. Leucemia linfoblástica aguda.....	4
2.4. Fenotipo MDR.....	5
2.5. La glicoproteína P estructura y función.....	7
2.6. El factor de transcripción YY1.....	14
2.7. Factor nuclear κ B.....	16
2.7.1. Inhibidores de NF- κ B.....	18
2.7.2. El modulador esencial de NF- κ B.....	20
2.7.3. Vías de activación de NF- κ B.....	22
3. Planteamiento del problema.....	25
4. Justificación.....	26
5. Hipótesis.....	27
6. Objetivo general.....	27
7. Objetivos particulares.....	27
8. Estrategia experimental.....	27
9. Resultados.....	37
10. Discusión.....	53
11. Conclusiones.....	61
12. Perspectivas.....	62
13. Bibliografía.....	63

ABREVIATURAS.

LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
Gp-170	Glicoproteína 170
NF-κB	Factor Nuclear κB
YY1	Ying Yang 1
AND	Acido Desoxirribonucleico
MDR	Multirresistencia a Drogas
ATP	Adenosín Trifosfato
ABC	Cassette de unión al ATP
NBD	Dominio de Unión a Nucleótidos
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
MAPK	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos
TAD	Dominio Activador Transcripcional
RHD	Dominio de Homología Rel
NEMO	Modulador Esencial de NF-κB
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FT	Factores de Transcripción

Resumen.

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda (LLA), constituye el 34.4% de todos los casos de cáncer tratados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Unos de los mecanismos que están implicados en la resistencia de las células tumorales a agentes antineoplásicos, es a través de la sobre-expresión de la proteína transmembranal de multirresistencia a fármacos gp-170. Se sabe que el promotor de esta proteína presenta sitios de unión para algunos factores de transcripción, como NF- κ B, que regulan la actividad de gp-170 después del tratamiento con doxorubicina. Recientemente, nuestro grupo demostró que el factor transcripcional YY1 regula de manera directa, la expresión de esta proteína transmembranal. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que involucren la participación de agentes antineoplásicos, en el desarrollo de la quimiorresistencia, a través de YY1. En este proyecto, nuestro interés se centró en evaluar los mecanismos implicados en la regulación de gp-170, vía la activación de YY1 mediada por NF- κ B, en células de LLA tratadas con doxorubicina.

Objetivo: Evaluar la activación de NF- κ B y YY1 en la expresión de gp-170, en la línea celular RS4;11, después del tratamiento con doxorubicina.

Estrategia experimental: Para evaluar la expresión de YY1, NF- κ B y gp-170 se hicieron ensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos anti YY1, anti p65 y anti gp-170. Se diseñaron plásmidos reporteros para evaluar la actividad transcripcional de YY1 mediante de ensayos de luciferasa.

Resultados: El tratamiento con doxorubicina (0.5 $\mu\text{g/ml}$) induce una mayor expresión de los factores de transcripción YY1 y NF- κB , así como de la proteína gp-170, en la línea celular RS4;11 a las 6 horas pos-tratamiento, comparado con las células sin tratar. La actividad del promotor de YY1 se vio disminuida en las células PC-3 transfectadas y tratadas con doxorubicina 1.5 $\mu\text{g/ml}$ por 6 horas, comparada con las células PC-3 sin transfección.

Conclusiones. Se demostró por primera vez que el tratamiento con doxorubicina 0.5 $\mu\text{g/ml}$, induce la activación de los factores de transcripción YY1 y NF- κB y de manera simultánea induce la expresión de la proteína gp-170, en la línea celular de leucemia linfoblástica aguda (RS4;11). Lo anterior sugiere la participación de los factores de transcripción YY1 y NF- κB en el desarrollo de quimiorresistencia.

La región de 1701 pb que fue clonada en el vector pGL3-basic, es una región promotora que dirige la expresión del gen de luciferasa, cuya actividad es más fuerte que la del promotor de MDR1 de 2000 pb, previamente clonado en el mismo vector.

1. Introducción

1.1. El cáncer y la leucemia.

El cáncer es una enfermedad que tiene como característica la pérdida del control del crecimiento celular. Ésta pérdida es generada por distintos factores epigenéticos y genéticos que alteran el ADN provocando mutaciones que afectan el crecimiento y la división normal de las células, por lo que la regulación del proceso de muerte se ve afectada y éstas no mueren cuando deberían morir, formándose células nuevas que no se necesitan [1*]. En la actualidad, el cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil en el mundo [1]. De los diversos tipos de cáncer registrados, las leucemias representan los de más alta frecuencia, de las cuales la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es de las más frecuentes en la infancia, abarcando cerca del 85 % de los casos [2] y demostrando un aumento gradual en los últimos años [3]. La leucemia linfoblástica aguda de células B, representa la segunda causa de muerte en el grupo de 0 a 14 años [2*]. En el Hospital Infantil de México, Federico Gómez (HIMFG), se reportan anualmente alrededor de 100 casos nuevos de LLA y constituyen el 34.4 % de todos los casos de cáncer tratados [4,5].

La leucemia se define como la proliferación neoplásica de células hematopoyéticas en una estirpe celular, con posterior proliferación y expansión, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión de sangre periférica y otros tejidos. En las leucemias agudas la población celular predominante está formada por células inmaduras (blastos), y en las crónicas, la celularidad presenta un mayor estadio

madurativo [6]. En la hematopoyesis normal las células de la sangre se forman en la médula ósea a partir de una célula troncal pluripotencial o “stem cell”. A partir de dicha célula se originaran las diferentes estirpes celulares: eritrocitos, leucocitos, plaquetas, linfocitos, etc. [7]. En la leucemia, la proliferación descontrolada de blastos, afecta a los linfocitos, los blastos se multiplican de manera descontrolada e interfieren en el funcionamiento de los órganos [8].

1.2. Clasificación de la leucemia.

La sociedad de leucemia y linfoma clasifica a las leucemias en cuatro principales grupos dependiendo el tipo de células implicadas (Tabla 1) [3*].

Tipos de leucemia.	
Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	Leucemia linfocítica crónica (LLC)
Leucemia mieloide aguda (LMA)	Leucemia mieloide crónica (LMC)

Tabla 1: Clasificación de la leucemia. Modificado de la sociedad de leucemia y linfoma [3*].

1.3. Leucemia linfoblástica aguda.

La LLA es la más frecuente en niños de 0 a 14 años en México [9] y se define como una alteración citogenética en la cual una serie de eventos multigénicos determinan la pérdida de los mecanismos que regulan la división y diferenciación celular, ocasionando la expansión monoclonal de una célula precursora de linaje linfoide [10]. Los diferentes acontecimientos que derivan a la transformación maligna surgen durante el desarrollo de la estirpe linfoide, los cuales presentan una alta tasa de proliferación y reordenamiento genético, lo que favorece la aparición de mutaciones espontáneas y de otras alteraciones citogenéticas [8].

Los factores genéticos tienen un papel cada vez más importante en la etiología de las leucemias agudas, ya que se ha observado una relación con las translocaciones cromosómicas, que determinan el pronóstico de las leucemias (Tabla 2)[11].

Cambios genéticos	Genes	Anotaciones/Pronósticos
Translocaciones de genes de receptores Ig t(8;14)(q34;q32) t(8;14)(q11;q32) t(14;19)(q32;p13) t(X,14)(p22;q32) t(6;14)(p21;q32)	MYC;IGH CEBPD;IGH IGH;EPOR CRLF2;IGH ID4;IGH	En células B maduras/pronóstico desfavorable
Genes Fusionados t(12;21)(p13;q22)	ETV6-RUNX1	Infantil pronóstico favorable
t(9;22)(q34;q21) t(1;19)(q23;p13) t(4;11)(q21;q23)	BCR-ABL1 E2A-PBX1 MLL-AF4	Adultos pronóstico desfavorable Infantil pronóstico desfavorable
t(9;11)(p22;q23) t(1;19)(q23;p13) del (X) del (Y)	MLL-AF9 MLL-ENL P2RY8-CRLF2	

Tabla 2: Anormalidades genéticas más frecuentes en LLA. Modificado de Graux C;[11]

La translocación t (4; 11) es la alteración cromosómica más común en infantes con LLA y representa el factor pronóstico más importante para predecir una falla en la recuperación clínica y que requerirá una quimioterapia más intensiva, comparado con los pacientes que no presentan esta translocación [11].

1.4. Fenotipo MDR.

Aunque en los últimos años se ha demostrado un avance importante en la eficacia de los agentes terapéuticos, existen casos que escapan a la eficacia de los tratamientos y las células tumorales se tornan resistentes a cualquier herramienta terapéutica conocida. Al respecto, un porcentaje importante de los pacientes (25-30%), desarrollan resistencia a los tratamientos [8,13]. Para los pacientes

pediátricos con LLA, el tratamiento más utilizado es la quimioterapia cuyo objetivo es provocar una remisión, sin evidencia de células blásticas leucémicas, ni en la sangre ni en la médula ósea y así restablecer la producción normal de células. Sin embargo, la eficiencia de la quimioterapia en estos pacientes es limitada. Varios pacientes desarrollan enfermedad recurrente después del tratamiento inicial y muchos de ellos no responden a la quimioterapia en la recaída [12].

Algunos niños tienen células residuales de leucemia en su médula ósea, incluso después de un tratamiento intensivo. Esta circunstancia se denomina “leucemia resistente al tratamiento”. Por otro lado, algunos pacientes cuya leucemia entró en remisión, después de la terapia, padecen la reaparición de células de leucemia en la médula ósea y una disminución de la cantidad de células sanguíneas normales. A esta situación se denomina “recaída” [13]. Actualmente en nuestro país, es difícil para los oncólogos clínicos proporcionar un tratamiento completamente apropiado para los pacientes con LLA. En la mayoría de los casos, para revertir esta resistencia, se administran altas dosis de los agentes antineoplásicos, lo que da lugar a efectos secundarios adversos en órganos sanos. El fenómeno donde las células tumorales se tornan resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes, es conocido como resistencia a múltiples fármacos o MDR (del inglés “*Multidrug Resistance*”) [9]. El objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es conseguir la muerte de la célula tumoral. Para ello es necesario que la mayor cantidad de fármaco activo llegue a su diana molecular en el interior de la célula y cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo, puede ser causa de resistencia. Lehnert en

1996, clasifica a los factores causantes de la resistencia como extracelulares e intracelulares (Tabla 3)[14].

Factores extracelulares.
Administración de una dosis insuficiente Inactivación metabólica Dificultad de acceder al tumor por una vascularización alterada Barreras fisiológicas Presencia en el tejido intersticial tumoral de moléculas como colágena que dificultan la difusión del fármaco
Factores intracelulares.
Disminución de la concentración del fármaco a nivel de su diana molecular. Se produce a través de la expulsión del fármaco por la membrana celular (p-gp “resistencia típica” o “clásica”), por secuestro en vesículas citoplasmáticas, por variaciones en el transporte entre el núcleo y el citoplasma o por alteraciones en el metabolismo intracelular del fármaco. Alteraciones de la diana molecular. Alteraciones en la topoisomerasa II denominado resistencia “atípica” Una vez conseguido el efecto el fármaco sobre su diana, evitan muerte celular. Dos alteraciones celulares destacan a este nivel, un aumento en la capacidad de reparación del ADN y la inhibición de la muerte celular programada o apoptosis.

Tabla 3: Factores causantes de resistencia a fármacos.

Modificado de Sánchez-Suárez P, et al; [14]

1.5. La glicoproteína P estructura y función.

La expulsión del fármaco fuera de la célula es el mecanismo de resistencia mas estudiado y fundamentalmente, esta relacionado con la actividad de determinadas proteínas trasportadoras [15]. La historia de las proteínas trasportadoras causantes de la resistencia a farmacos o proteínas MDR, se inicia en 1973 con el descubrimiento por Keld Dano, al observar la expulsión de la daunomicina en células tumorales resistentes. Estas células habian sido expuestas unicamente a esta droga, pero presentaban resistencia cruzada con la doxorrubicina y los alcaloides de la vinca [16]. Estudios posteriores describieron el fenotipo celular resistente a múltiples drogas o fenotipo MDR, no fue hasta 1976 cuando Juliano y Ling, descubrieron una glicoproteína en la membrana plasmatica de células multi-resistentes, que por sus carecteristicas parecia ser una bomba de expulsión [17].

Fue hasta 1983, cuando Victor Ling y otros investigadores, dieron a conocer que el aumento de esta proteína llamada “Glicoproteína P” (P-gp), estaba implicada en la resistencia a múltiples drogas, en líneas celulares de mamíferos [18]. Estas proteínas se encuentran distribuidas en diferentes tejidos del organismo humano como son el riñón, hígado, epitelio digestivo y respiratorio, así como en tumores que de ellos se derivan. Su distribución en tejidos con funciones secretoras-excretoras hace pensar que desempeñan funciones fisiológicas de protección ante toxinas exógenas [19]. Estas proteínas son miembros de la familia de transportadores dependientes de ATP y juegan un papel importante en roles fisiológicos, transportando compuestos hidrofóbicos y los defectos en sus funciones, están relacionados con varias enfermedades [20]. Hasta el momento se han descrito 48 diferentes transportadores ABC (del inglés “*ATP Binding Cassette*”) que han sido identificados en el genoma humano, divididos en siete diferentes clases (A-G), con base en la similitud de sus secuencias. Cuatro miembros de estas clases (A, B, C, y G), se ha visto que participan en la resistencia a drogas en células en cultivo (Tabla 4) [21].

Nombre común	Nombre sistemático	Tejido	Sustratos normales	Sustratos de quimioterapia
ABCA2	ABCA2	Cerebro, monocitos	Derivados de esteroides, lípidos	Estramustina
Pgp/MDR1	ABCB1	Intestino, hígado, riñón, placenta, barrera hematocefálica	Compuestos orgánicos neutros y catiónicos.	Doxorubicina, daunorubicina, vincristina, vinblastina, actinomicina-D, paclitaxel, docetaxel, etoposido, teniposido, bisantreno, homoharringtonina, gleevec (STI-571)
MDR2	ABCB4	Hígado	Fosfatidilcolina	Paclitaxel y vinblastina
MRP1	ABCC1	Todos los tejidos	Glutatión y otros conjugados, aniones orgánicos, leucotrienos C4	Doxorubicina, epirubicina, etoposido, vincristina, metotrexato
MRP2, cMOAT	ABCC2	Hígado, riñón, intestino	Similares a MRP1, sales no biliares y aniones orgánicos	Metotrexato, etoposido, doxorubicina, cisplatino, vincristina, mitoxantrona
MRP3	ABCC3	Páncreas, riñón, intestino, hígado, glándulas adrenales	Glucorato y conjugados de glutatión, ácidos biliares	Etoposido, teniposido, metotrexato, cisplatino, vincristina, doxorubicina
MRP4	ABCC4	Próstata, testículos, ovarios, intestino, páncreas, pulmón	Análogos a nucleósidos, aniones orgánicos	Metotrexato, tiopurinas
MRP5	ABCC5	En la mayoría de los tejidos	Análogos a nucleósidos, nucleótidos cíclicos, aniones orgánicos	6-mercaptopurina, 6-tioguanina
MRP6	ABCC6	Hígado, riñón	aniónicos cíclicos pentapéptidos	Desconocido
MRP7	ABCC10	Hígado, corazón, riñón	Conjugados de glutatión, aniones lipofílicos	Desconocido
MXR, BCRP, ABC-P	ABCG2	Placenta, intestino, pecho, hígado	Prazosin	Doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, topotecan, SN-38
BSEP, SP-gp	ABCB11	hígado	Sales biliares	Paclitaxel

Tabla 4: Principales transportadores en la resistencia a fármacos. Modificado de Ueda, K; [21].

Al gen que codifica a P-gp se le conoce como *mdr1* y se localiza en el cromosoma 7q21 y consiste de una región promotora y 29 exones [21]. Su ARNm es de 4,872 nucleótidos de longitud y el producto génico, la glicoproteína P, es una proteína transmembranal de 170-kD por lo que también es llamada comúnmente gp-170, una proteína de 1,280 aminoácidos con dos mitades simétricamente idénticas conectadas por una región corta de unión. Cada mitad consiste en 6 hélices α transmembranales (TM) seguidas por un dominio de unión a nucleótidos (NBD), en el cual el ATP es hidrolizado para dinamizar el transporte (Figura 1) [22].

La proteína gp-170 se expresa de manera constitutiva en tejido normal y su función fisiológica es la de una bomba expulsora dependiente de ATP, [23]

previenen la absorción de compuestos lipofílicos tóxicos de varias estructuras en el intestino, que son expulsados en la bilis y la orina del riñón e hígado, respectivamente. Hasta la fecha, se ha reportado que gp-170 transporta una gran cantidad de fármacos no relacionados estructuralmente y participa en su farmacocinética [24].

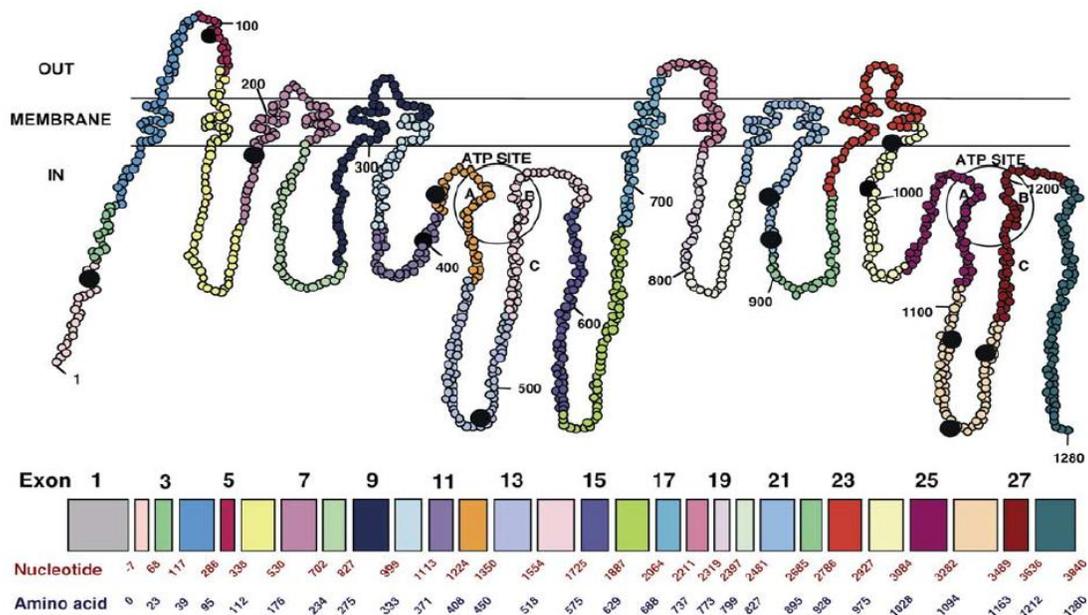


Figura 1: Estructura de la glicoproteína P (gp-170).
Tomado de Ambudkar, S.V., *et al*; [22]

La gp-170 presenta amplia especificidad de sustrato por fármacos estructuralmente diferentes y, por consiguiente, media la resistencia a una variedad de medicamentos, incluidos los alcaloides de la Vinca, antraciclinas, epipodofilotoxinas (alcaloides naturales), taxoles, actinomicina D, glucósidos cardíacos, agentes inmunosupresores, glucocorticoides y los inhibidores de la proteasa anti VIH [25]. Estos fármacos, aunque presentan diferencias en su estructura y mecanismo de acción, tienen características comunes como ser

compuestos de origen natural, lipofílicos y con peso molecular entre 300 y 900 Da que entran en la célula por difusión pasiva [26].

Recientemente se ha descrito que la expresión de los transportadores ABC es altamente regulado, particularmente a nivel de la transcripción, lo que sugiere que pudiera ser un blanco potencial para la modulación del fenotipo MDR [27].

Cuando gp-170 está asociada con el fenotipo de MDR, se ha relacionado con un incremento del ARNm de *MDR1* que puede estar vinculado, tanto a la amplificación de genes, como a un aumento en la transcripción de genes [28].

Casi la mitad de todos los genes transcritos por la ARN polimerasa II (Pol II) contienen una caja TATA, una secuencia conservada ~25-35 pares de bases del sitio de inicio de transcripción en dirección 5', el cual tiene como función, ubicar a la ARN polimerasa para el inicio de la transcripción [29]. Por lo tanto, el primer evento es el reconocimiento y la unión a la caja TATA por un factor de transcripción general conocido como TBP (del inglés "*TATA-binding protein*") en promotores que contienen este elemento [28].

Interesantemente, todos los transportadores relacionados con el transporte de drogas examinadas, carecen de una caja TATA. La regulación de la transcripción de *mdr1* es regulada por un elemento iniciador (Inr) necesario para dirigir la transcripción basal en el punto de inicio de arranque principal [30]. En la mayoría de los promotores que carecen de caja TATA, se presentan elementos "GC" y cajas "CCAAT" como lo es el caso de *mdr1*. Cada elemento puede interactuar con diferentes familias de proteínas a través de la secuencia específica de

reconocimiento de ADN, la caja CCAAT (-79 a -75) que se ha descrito que interactúa con el factor de transcripción trimérico NF-Y [31] mientras que los elementos ricos en GC (-53 a -43), se ha observado que interactúan con miembros de la familia de factores de transcripción Sp, específicamente Sp1 y Sp3 [32] además de otros factores que interactúan con la región promotora de *mdr1* (Figura 2)[33].

Los factores de transcripción son proteínas que interaccionan con regiones específicas del ADN y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores transcripcionales. Al conectar los estímulos externos e internos con las respuestas celulares, actúan como transductores de señales [30].

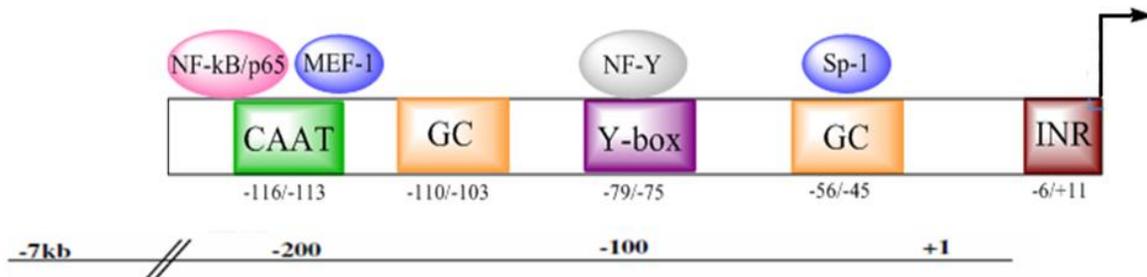


Figura 2: Elementos estructurales del promotor de gp-170 y factores de transcripción que interactúan en esa región. Modificado de Higgins, C; [27] y Labialle, S., *et al*; [33].

Como se mencionó en la tabla 4, uno de los fármacos normalmente utilizados en el tratamiento de pacientes pediátricos en la quimioterapia es la Doxorubicina, (Adriamycin®, Rubex® o Doxil®) un antibiótico antracíclico citotóxico que inhibe la multiplicación de las células tumorales, ya sea al intercalarse en la doble hélice del ADN y bloquear los procesos de replicación y transcripción o bien al bloquear la actividad de la enzima topoisomerasa II [34]. Hui y colaboradores en el 2008, usando como modelo la línea celular K562 de leucemia mielógena crónica,

resistente al agente quimioterapéutico doxorubicina, mostraron que la condición de resistencia a múltiples fármacos, está asociada no solo con un incremento en la expresión de FOXO3a, sino también que este factor transcripcional incrementa la expresión de gp-170 y que la doxorubicina induce la fosforilación de Akt, así como también de FOXO3a [35].

Por otro lado, en 2011, se publicó un reporte que describe la interacción del factor transcripcional YB-1, sobre el promotor de *mdr1*, en un modelo celular de linfoma de células B resistente a doxorubicina. Se demostró que la expresión de gp-170 está asociada a una mayor translocación del factor transcripcional YB-1 y a la activación de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos MAPK/ERK. Los resultados indican un incremento en la fosforilación de ERK en este modelo, después del tratamiento con concentraciones crecientes del fármaco, lo que sugiere que la vía MAPK/ERK participa directamente en la inducción a la quimiorresistencia, mediada por este factor transcripcional [36]. Estos reportes indican la participación directa de factores de transcripción en la sobreexpresión de gp-170, después del tratamiento con doxorubicina. Sin embargo, existen otros factores de transcripción que pudieran participar en la inducción a la quimiorresistencia a fármacos y cuya participación aún no ha sido explorada.

Al respecto, estudios realizados por la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, demostraron que el promotor de *mdr1* contiene sitios específicos de unión para YY1 y que este factor transcripcional regula directamente la expresión de gp-170, a través de la activación de su promotor. Lo anterior fue determinado utilizando plásmidos reporteros [37].

1.6. El factor de transcripción YY1.

El factor de transcripción YY1 está altamente conservado entre diferentes especies, en humanos se localiza en la región del telómero del cromosoma 14 en el segmento q32.2, y consiste de cinco exones altamente conservados que codifican una proteína de 414 aminoácidos de longitud, con un peso molecular estimado de 44 KDa [38]. La proteína YY1 contiene cuatro motivos de unión al ADN tipo dedos de zinc C2H2, que son estructuras que requieren zinc para su actividad de unión. Este tipo de proteínas usualmente están organizadas en series de 9 dominios repetidos que contienen 30 aminoácidos plegados en una unidad estructural simple, alrededor de un átomo de zinc, al que se unen cisteínas e histidinas en número variable (Figura 3)[39].

El factor de transcripción YY1 tiene un papel fundamental en los procesos biológicos normales como el desarrollo, la diferenciación, la replicación y proliferación celular y ejerce sus efectos en un gran número de genes implicados en estos procesos. Los mecanismos de acción de YY1 se relacionan con su capacidad de iniciar, activar o reprimir la transcripción dependiendo del contexto en el que se une [40].

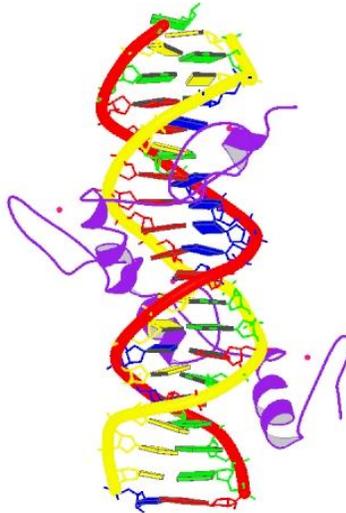


Figura 3: Factor de transcripción YY1. Tomado del banco de datos de proteínas. [4*]

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 [41]. Varios reportes son consistentes con la hipótesis de que la sobreexpresión de YY1 y/o activación está asociada con la proliferación celular incontrolada, la resistencia a los estímulos apoptóticos, tumorigénesis y a un potencial metastásico [42]. No obstante, la participación de YY1 en los mecanismos de resistencia a fármacos es aún desconocida.

Usando como modelo experimental la línea celular de leucemia linfoblástica aguda RS4;11 y de leucemia mielogénica crónica REH, recientemente encontramos que el tratamiento con doxorubicina (0.5 $\mu\text{g/ml}$) en estas células, indujo una mayor expresión de YY1 a las 8 y 24 horas, comparado con células sin tratar, lo cual fue determinado mediante ensayos de inmunocitoquímica y citometría de flujo. Debido a que YY1 está siendo activado, después del estímulo con doxorubicina, es razonable pensar que YY1 regula la expresión de gp-170 a nivel transcripcional.

Sin embargo, hasta el momento no sabemos de qué manera ocurre esta regulación.

Existe evidencia indirecta que sugiere la regulación transcripcional recíproca entre el factor de transcripción NF- κ B y YY1 según el contexto celular [44,43] así como también hay evidencias de que NF- κ B también participa en la resistencia a fármacos [44].

1.7. Factor Nuclear- κ B.

NF- κ B fue descubierto en el laboratorio de David Baltimore como un activador nuclear, uniéndose específicamente a una secuencia de diez pares de bases (5'-GGGACTTCC-3') presente dentro del potenciador del gen de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina, en las células B maduras productoras de anticuerpos [46]. Desde entonces se han descrito varios genes regulados por NF- κ B que incluyen aquellos que controla la muerte celular programada (apoptosis), adhesión celular, proliferación, la respuesta inmune innata y adaptativa, inflamación, la respuesta al estrés celular y remodelación de tejidos [45].

La familia de factores de transcripción de NF- κ B consiste en cinco miembros: p50/p105, p52/p100, p65 (RelA), c-Rel y RelB codificados por *nfkb1*, *nfkb2*, *relA*, *relC* y *relB* respectivamente. Todos los miembros de esta familia tienen aproximadamente un dominio de 300 aminoácidos conservados, llamado dominio de homología rel o RHD (del inglés “*Rel Homology Domain*”) que está localizado en el dominio N-terminal y es responsable de la unión al ADN, con gran afinidad, además de que también participa en la homodimerización y heterodimerización de

estos (figura 4). El sitio de unión al ADN es denominado elementos κ B en promotores y potenciadores de los genes blanco y su unión regula la transcripción a través del reclutamiento de coactivadores y correpresores [46].

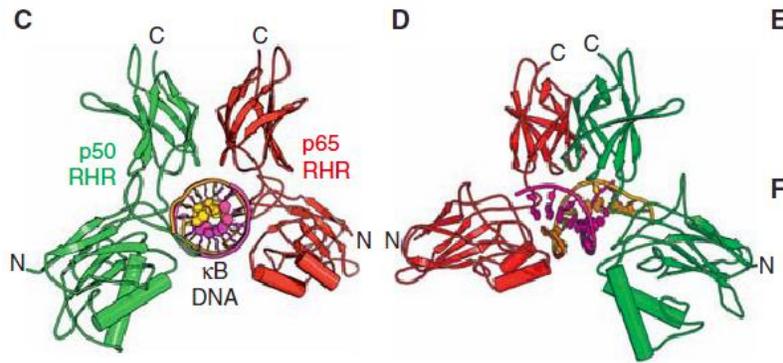


Figura 4: Unión de los factores de transcripción al surco mayor del ADN. Tomado de Huxford, T. y G. Ghosh;[47]

El dominio de activación transcripcional o TAD, (del inglés “*Transcription Activation Domain*”) se encuentra en el extremo carboxilo-terminal y es necesaria para la regulación positiva de la expresión de genes (Figura 5) y solo está presente en p65, c-Rel y RelB. La falta de este dominio como lo es en p50 y p52, reprime la transcripción, a menos que se unan a un miembro de la familia que posea el dominio TAD u otras proteínas capaces de reclutar un coactivador [48]. Las subunidades p50 y p52 son sintetizadas como proteínas precursoras p105 y p100, las cuales contienen repeticiones de motivos de anquirina en la región C-terminal, como en el caso de las proteínas inhibidoras I- κ B, las cuales no pueden translocar al núcleo para ejercer su efecto por la falta del dominio TAD [49].

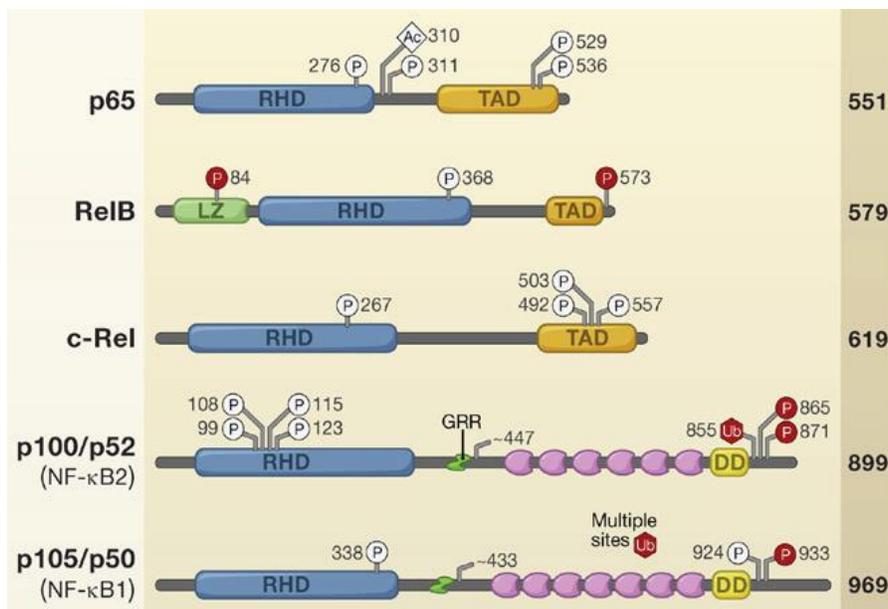


Figura 5: Estructura de los diferentes miembros de la familia de factores de transcripción NF-κB. Tomado de Hayden, M.S. and S. Ghosh; [49].

1.7.1. Inhibidores de NF-κB.

Los factores de transcripción NF-κB están regulados por las interacciones proteína-proteína y modificaciones pos-traduccionales [50]. En la mayoría de las circunstancias, las proteínas NF-κB se encuentran en el citoplasma, ya que están unidas a un inhibidor llamado IκB (inhibidor de NF-κB) y por lo tanto, al interactuar con estas, las hace inactivas [49].

Todas las proteínas IκB consisten en un dominio central que contiene de 6 a 8 repeticiones de anquirina, las cuales regulan la interacción con los dímeros de NF-κB (Figura 6), lo que genera que el complejo resida en el citoplasma bloqueando su acceso al ADN. Estos motivos de anquirina aproximadamente una secuencia de 33 aminoácidos, son parte de una súper familia de motivos de repetición helicoidal que incluyen repeticiones HEAT, armadillo y repeticiones ricas en

leucina, que son comunes en proteínas involucradas en interacciones proteína-proteína [46].

En células de mamíferos existen tres principales I κ Bs, I κ B α , I κ B β y I κ B ϵ , las cuales funcionan en parte, enmascarando la secuencia conservada de localización nuclear (NLS) que se encuentra en la región RHD de las subunidades de NF- κ B. Estas I κ Bs tienen una región N-terminal que posee un sitio de serinas conservadas que son fosforiladas por IKK. Aproximadamente 10 aminoácidos a este par de serinas se encuentra un sitio conservado de lisinas para la poliubiquitinación. I κ B α además presenta una secuencia de exporte nuclear, lo que permite formar dímeros con subunidades de NF- κ B. En la región C-terminal, I κ B α y I κ B β poseen una secuencia corta rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina, llamada PEST, que es requerida por su habilidad de interrumpir los complejos formados por NF- κ B y el ADN [51].

Existen además de las proteínas clásicas I κ Bs que ya se describieron anteriormente, las proteínas no clásicas, representadas por los precursores p105 y p100. A estos complejos se les ha denominado NF- κ Bsomas para distinguirlos de los pequeños complejos inhibitorios, formados por I κ B α , I κ B β y I κ B ϵ . Además existen las proteínas I κ B nucleares, representadas por Bcl-3, I κ B ζ /MAIL y I κ BNS, cuya clasificación deriva en el hecho de que contienen repeticiones de anquirina, lo que les permite la unión a subunidades de NF- κ B y las concentra dentro del núcleo [51]. La asociación de los inhibidores y las subunidades de NF- κ B va a tener diversas e importantes consecuencias en la expresión de genes.

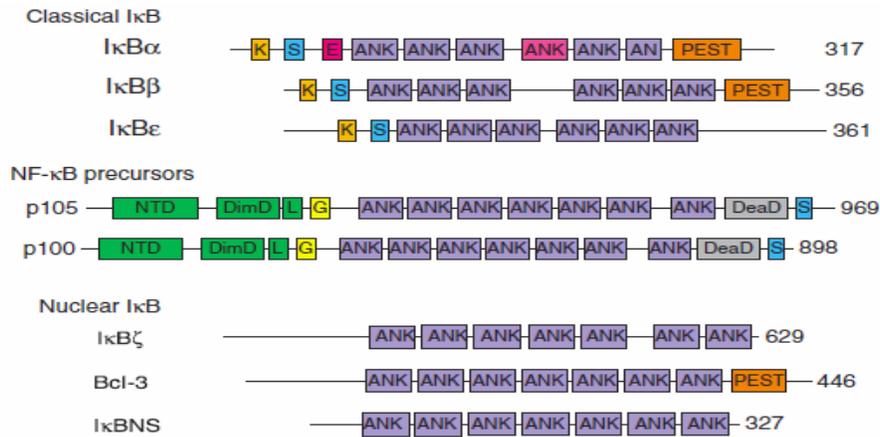


Figura 6: Estructura de los diferentes inhibidores de NF-κB en mamíferos. Tomado de Huxford, T. and G. Ghosh; [50].

1.7.2. El modulador esencial de NF-κB.

Para mantener a NF-κB en estado inactivo, es necesario que los inhibidores (IκBs) impidan su unión al ADN, pero cuando existe una exposición a un estímulo se induce al complejo IKK también conocido como NEMO (del inglés “*NF-κB Essential Modulator*”) [52,53]. El complejo activado IKK fosforila dos residuos de serinas en IκB, lo que da la señal para la ubiquitinación de los residuos cercanos de lisina. Esto permite la degradación de IκB por el proteosoma, liberar el complejo de NF-κB que entra al núcleo y modular la expresión de sus genes blanco (Figura 7) [54].

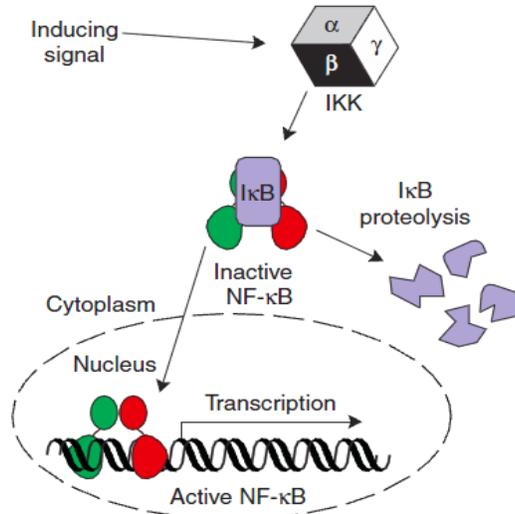


Figura 7: Activación de NF-κB por la degradación del inhibidor.
Tomado de Huxford, T. and G. Ghosh;[50]

IKK está compuesto por tres polipéptidos: IKK α , IKK β y IKK γ en donde IKK α , IKK β son subunidades catalíticas del complejo cinasa. NEMO (IKK γ) no tiene actividad cinasa pero es requerido para la activación del complejo, ya que sirve como un sensor de andamiaje de proteínas para las subunidades catalíticas. Algunas veces NEMO lleva el complejo IKK, al receptor de unión del ligando en la membrana plasmática que es requerido para la activación de la vía [54].

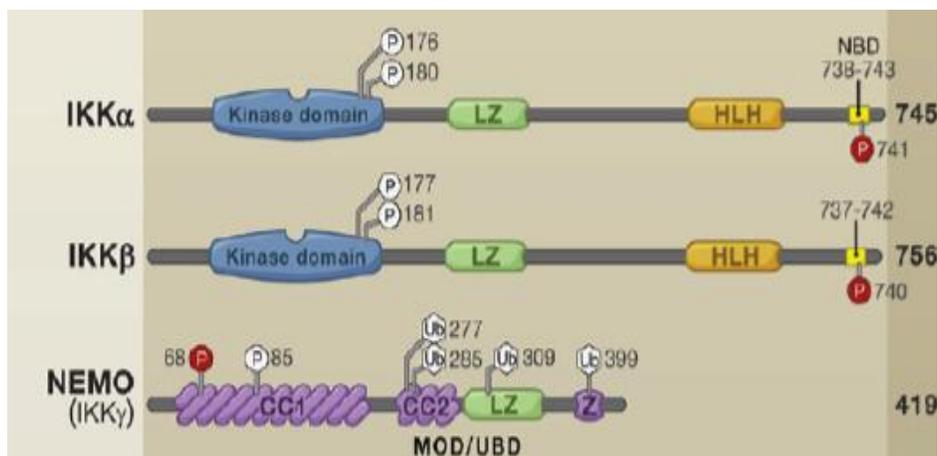


Figura 8: Estructura de las subunidades que conforman el complejo cinasa IκB Tomado de Hayden, M.S. and S. Ghosh; [49].

1.7.3. Vías de activación de NF- κ B.

Existen dos vías de activación de NF- κ B, la vía canónica o clásica que es desencadenada por LPS, TNF α o IL-1 activándolas subunidades p65/RelA y c-Rel. Por otra parte, la vía no canónica, es activada por la estimulación de CD40, los receptores de la linfotoxina B, el factor activador de células de la familia de TNF (BAFF), LPS y la proteína de membrana latente 1 (LMP1) del virus de Epstein Barr. Estos estímulos inducen la activación del heterodímero p52/RelB [55].

Además de las ya descritas, existen vías que son atípicas a las conocidas, que son activadas por distintos factores que se presentan en las células. Un ejemplo de esto, es el caso de la activación por medio del estrés genotóxico o drogas quimioterapéuticas, en la cual participa la cinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM) para llevar a cabo la activación de las subunidades de NF- κ B. Otros estímulos como la hipoxia, el peróxido de hidrógeno, el tratamiento con el factor de crecimiento neuronal (NGF) y la radiación UV provoca que distintas cinasas activen la vía NF- κ B [49].

En las vías descritas, el heterodímero que más se presenta es p50:p65/RelA, el cual es uno de los más estables y por tanto, el que tendrá mayor participación en la regulación de la expresión de genes blanco [49].

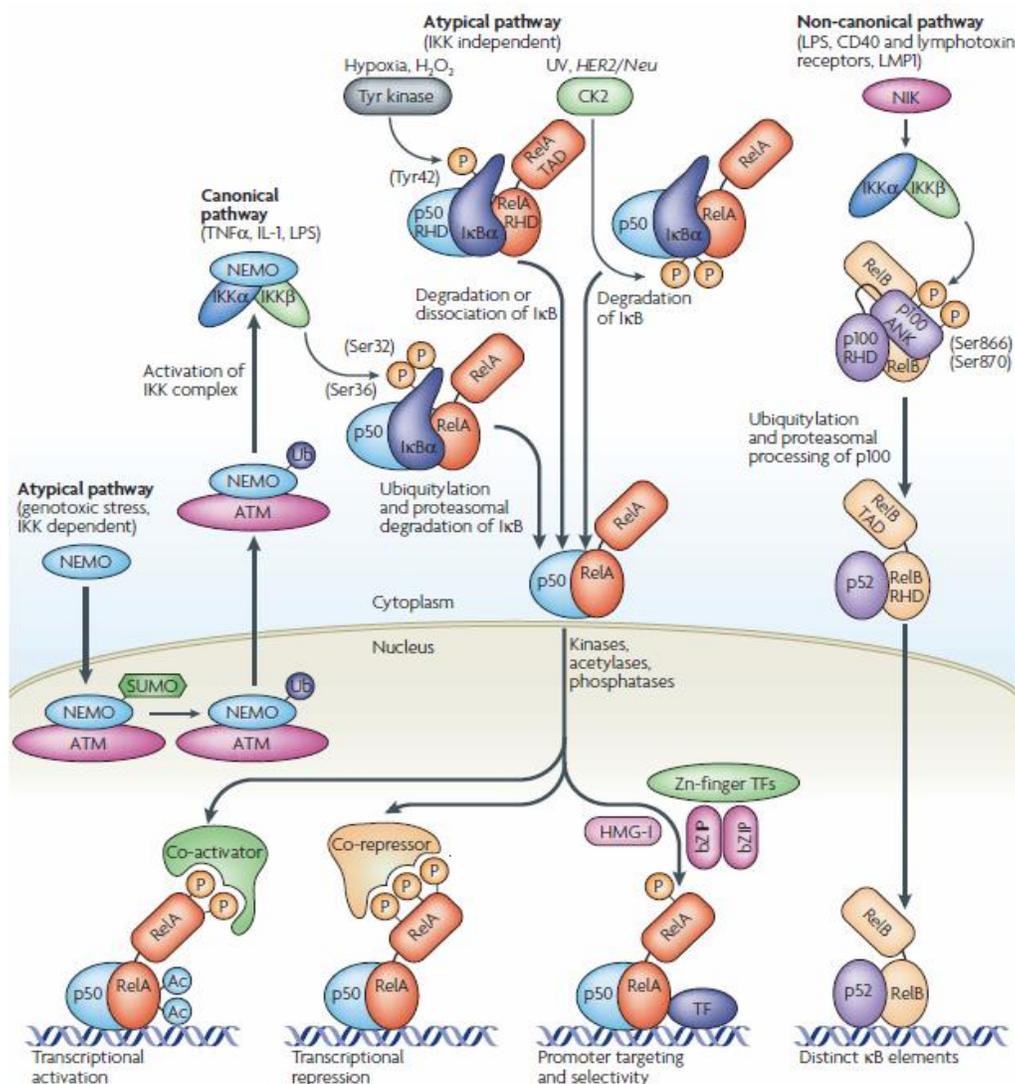


Figura 8: Diferentes vías de activación de NF- κ B. Tomado de Perkins, N.D; [49].

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que NF- κ B participa en el desarrollo de multirresistencia a fármacos. En el 2003, Bentires-Aij y cols., demostraron que la inhibición de la actividad de NF- κ B sensibiliza a las células resistentes de cáncer de colon a la daunomicina (un antineoplásico muy similar a la doxorubicina), a través de una disminución de la expresión del gp-170 [58].

Estos resultados sugieren que NF- κ B y sus componentes heterodiméricos, pueden desempeñar múltiples funciones en la regulación del gen *mdr1* humano, el cual

puede ser específico del tipo celular. Interesantemente, Bentires-Alj y Cols., en el 2003, habían identificado una secuencia consenso para NF- κ B, en el primer intrón del promotor de *mdr1*. Cuando mutan este sitio de unión para NF- κ B, no afectan significativamente la expresión de su plásmido reportero. Con estos resultados, los autores sugieren que otros sitios menos conservados para NF- κ B, probablemente están vinculados en la regulación del promotor de *mdr1*, por lo que concluyen que los mecanismos exactos que explican la regulación de la expresión humana de gp-170 por NF- κ B, aún no se ha determinado del todo [58].

En el presente trabajo, nosotros propusimos que existe una contribución sinérgica de los factores transcripcionales NF- κ B y YY1, en la regulación de la expresión de gp-170, después del estímulo con un agente quimioterapéutico como lo es la doxorubicina. En células sin tratamiento se espera que el factor transcripcional NF- κ B sea estabilizado en el citoplasma, en un estado inactivo por la proteína I κ B. El tratamiento con doxorubicina podría propiciar la fosforilación y degradación de la proteína I κ B, lo que conllevaría a la liberación de NF- κ B. Una vez liberado, este translocaría al núcleo y activaría la expresión de gp-170. La conexión de NF- κ B con YY1 para la regulación de la expresión de gp-170, ocurriría también a nivel transcripcional. Huerta-Yeppez y cols., en el 2006, analizaron la región promotora del gen *yy1* y encontraron cuatro sitios hipotéticos de unión para NF- κ B, a 227pb del sitio de inicio de la transcripción, lo que sugiere que NF- κ B podría estar regulando al factor transcripcional YY1 [46]. Sin embargo, los autores no evaluaron la actividad transcripcional de NF- κ B sobre el promotor de YY1. De

esta manera, es razonable pensar que la translocación de NF- κ B debido al estímulo con doxorubicina, permitirá transactivar simultáneamente el promotor de YY1, lo que induciría un aumento en su expresión. A su vez, el aumento en los niveles de YY1, permitiría que la unión de este factor a los sitios consenso, previamente identificados por nuestro grupo, sobre el promotor de *mdr1* [37]. Esta regulación impactaría de manera sinérgica en los niveles de gp-170, en una forma dependiente de NF- κ B y por tanto, este sería el mecanismo molecular por el cual, las células leucémicas adquieren resistencia a la doxorubicina. (Figura 9)

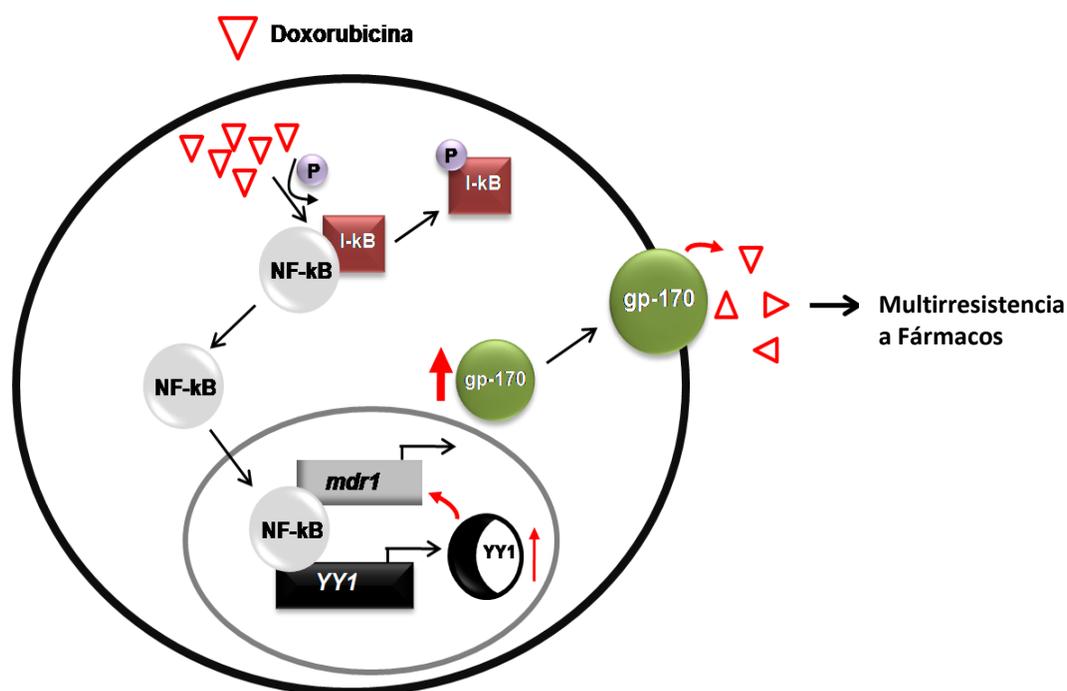


Figura 9: Representación esquemática de la posible regulación de gp-170, a través de la sobreexpresión de YY1 dependiente de NF- κ B, después del estímulo con doxorubicina.

2. Planteamiento del problema

Uno de los mecanismos implicados en la quimiorresistencia es la sobreexpresión de la gp-170, la cual provoca la expulsión de los fármacos que ingresan a la célula. Se sabe que el promotor de *mdr1* presenta sitios de unión para YY1 y NF-

κ B, que regulan su actividad. Sin embargo, hasta el momento no se sabe cómo el tratamiento con doxorubicina, induce la sobreexpresión y/o actividad de ambos factores transcripcionales en LLA y por lo tanto si participan o no en la inducción a la quimiorresistencia.

3. Justificación

Aunque en los últimos años se ha demostrado un avance importante en la eficacia de los agentes terapéuticos, existen casos que escapan a la eficacia de los tratamientos y las células tumorales se tornan resistentes a cualquier tratamiento terapéutico conocido. Para los pacientes pediátricos con LLA, el tratamiento más utilizado es la quimioterapia. Sin embargo, la respuesta a la quimioterapia en estos pacientes es limitada, debido a que varios pacientes desarrollan enfermedad recurrente después del tratamiento inicial y muchos de ellos no responden a la quimioterapia en la recaída.

Está claro que la resistencia a la quimioterapia se ha convertido en un obstáculo importante en el tratamiento contra el cáncer. Como ya se comentó, gp-170 es uno de los mecanismos de resistencia más estudiado, pero el mecanismo exacto de regulación de la expresión de esta glicoproteína no ha sido elucidado. Es por ello que el abordar el o los mecanismos que propicien la resistencia a doxorubicina, a través de la regulación de YY1 mediada por NF- κ B, en un modelo de LLA, permitirá sugerir a los oncólogos clínicos, la posibilidad eventual de instaurar nuevos esquemas de tratamiento para aquellos pacientes resistentes a los agentes quimioterapéuticos utilizados y potencialmente proponer nuevos blancos terapéuticos que permitan revertir dicha resistencia.

4. Hipótesis

Si se tratan a las células RS4;11 con un agente antineoplásico como la doxorubicina, entonces podrá aumentar significativamente la activación del factor de transcripción YY1, a través de la vía NF- κ B.

5. Objetivo general.

Evaluar el efecto de la doxorubicina sobre la expresión de gp-170, a través de la activación de NF- κ B y YY1.

6. Objetivo particulares.

1. Determinar el nivel de expresión de MDR1, YY1, y NF- κ B, en células RS4;11 después del tratamiento con doxorubicina, mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo.
2. Analizar la región promotora de YY1 mediante los programas Genomatix suite y TESS, para la búsqueda de posibles sitios de unión de NF- κ B.
3. Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR, la región promotora de YY1.
4. Clonar la región promotora en el vector pGL3 Basic-vector.
5. Evaluar la actividad transcripcional de NF- κ B sobre el promotor de YY1, mediante ensayos reporteros de luciferasa.

7. Estrategia experimental.

Líneas celulares, cultivo y tratamientos.

La línea celular RS4;11 (ATCC Catalog No. CRL-1873) se estableció de una muestra de médula ósea de una mujer caucásica de 32 años diagnosticada con leucemia linfoblástica aguda, las células tienen una anomalía cromosómica característica t(4;11)(q21;q23). Además posee un isocromosoma en el brazo largo

del cromosoma 7. Esta anomalía característica es la translocación que se relaciona con un pronóstico desfavorable en niños con leucemia linfoblástica aguda además de un tratamiento quimioterapéutico más intensivo [11]. Las células se cultivaron a 37 °C, 5 % CO² en medio RPMI 1640 (Invitrogen, GIBCO), suplementado con 5% de suero fetal bovino, 2 mmol/L de L-glutamina, penicilina y estreptomicina. Posteriormente las células se trataron con doxorubicina (Doxolem[®] RU 10mg) a 0.1, 0.25 y 0.5 µg/ml.

Citometría de Flujo

Preparación de núcleos

Las células cultivadas tratadas con doxorubicina, fueron cosechadas a las 6 h pos tratamiento. Se cosecharon con base en previos reportes que indican que a este tiempo, NF-κB se transloca al núcleo [56,57]. Las concentraciones de doxorubicina utilizada fue de 0.1, 0.25 y 0.5 µg/ml. Después del tratamiento, las células fueron centrifugadas 6,000 rpm/2'. Después de la centrifugación el sobrenadante fue eliminado y el botón celular se incubó en un baño con hielo seco/etanol por 10', con excepción del vial que solamente contenía las células que no eran teñidas. Este vial se resuspendió en 400 µl de PBS/1 % de paraformaldehído y se mantuvo a 4 °C hasta el análisis por citometría.

Posteriormente los núcleos fueron resuspendidos en 100 µl de buffer hipotónico (10 mM de HEPES, 10 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl² y 1 mM del agente reductor DTT, pH = 7.9). Después se evaluó la integridad de los núcleos mediante la tinción de azul tripano usando 1µl de muestra y 1µl de azul tripano (1:1).

Los núcleos se recuperaron a 3000 rpm durante 10' a 4 °C por centrifugación. Se retiró completamente el sobrenadante y los núcleos se fijaron añadiendo 100 µl de PBS/4 % de paraformaldehído por 20' a 4 °C, previo a la tinción.

Tinción Nuclear

Para la tinción nuclear primeramente los núcleos se permeabilizaron con 100 µl de PBS frío/4 % de paraformaldehído/0.1 % de tritón X-100, durante 10' a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron 1' a 4500rpm/4 °C y después de retirar el sobrenadante, se procedió a bloquear con 100 µl de PBS/4 % de SFB y la muestra fue incubada por 20' en hielo.

Se procedió a poner los anticuerpos primarios en 100 µl de PBS/4 % de SFB, a una dilución de 1:50 de anticuerpo primario dirigido contra p65 (sc-109; Santa Cruz Biotechnology) y contra YY1 (H-414, sc-1703; Santa Cruz Biotechnology), durante 20' en hielo. Posterior a la incubación, los núcleos se lavaron, adicionando 400 µl de PBS/4 % de SFB y se centrifugaron 1' a 4500 rpm/4 °C. El sobrenadante fue descartado y el botón se resuspendió en 100 µl de PBS/4 % de SFB, conteniendo 2 µl de anticuerpo secundario anti-conejo, acoplado con FITC y se incubó durante 20' en hielo.

Los núcleos se lavaron adicionando 400 µl de PBS + 4 % de SFB, los tubos se invirtieron varias veces y se centrifugaron 1' a 4500 rpm/4 °C. Se procedió a retirar el sobrenadante y se resuspendió en 300 µl de PBS + 1 % de paraformaldehído y se mantuvieron a 4 °C hasta el análisis.

Tinción de membrana

Para la tinción de la proteína MDR1, primeramente las células RS4;11 tratadas con doxorubicina, se lavaron con PBS y posteriormente lavadas con FACSFlow (0.1% de azida de sodio, 2% de suero de caballo y 5mM de EDTA), para luego agregar el anticuerpo primario antiMDR1(Chemicon international), hecho en conejo, a una dilución de 1:50. El tiempo de incubación fue de 30' a 4 °C, en obscuridad. Después de eliminar el anticuerpo primario, se incubo nuevamente 30 minutos con el anticuerpo secundario, a una dilución 1:50 a 4 °C, en obscuridad. Se realizaron dos lavados para eliminar el anticuerpo secundario y las células fueron fijadas en PBS/paraformaldehído al 4 % durante 20' a 4 °C, previo al análisis por el citómetro.

Inmunofluorescencia.

Las células RS4;11 se sembraron 16 h previo al experimento en una placa de 24 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Posteriormente, se les dio un tratamiento con doxorubicina a una concentración de 0.5 µg/ml durante 6 h.

Las células tratadas con doxorubicina fueron lavadas con PBS, y fijadas en laminillas con acetona por 10' a 4 °C. Posteriormente se procedió a bloquear y permeabilizar con PBS/0.1 % TritónX-100/BSA por 1h/Temperatura ambiente (TA). Posterior a esta incubación, las células fueron lavadas 2 veces por 3' con PBS, para luego agregar el anticuerpo primario antiMDR1 (Chemicon International). Para NF-κB se utilizó el anticuerpo anti p65 (sc-109; Santa Cruz Biotechnology) y para YY1 el anticuerpo H-414 (sc-1703, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución

1:50. El tiempo de incubación fue 1h a 4 °C, en agitación constante. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS 3' para eliminar el anticuerpo primario, se incubo nuevamente 45' a 4 °C con el anticuerpo secundario, a una dilución 1:50.

Para teñir los núcleos, las células fueron incubadas con 50 µl del colorante DQ7™ (DR71000; Biostatus) a una dilución 1:50. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%/20'4 °C e inmediatamente después, se procedió a montar con 5 µl de Vectashiel (Vector Lab), se cubrió con un porta objetos y se selló con resina. Las laminillas se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz, hasta el análisis en el microscopio confocal.

Análisis informático.

Para la búsqueda de posibles sitios de unión para NF-κB, sobre la región promotora de YY1, se utilizó el programa Genomatix (<http://www.genomatix.de/>) y el sistema de búsqueda de elementos de transcripción o TESS (del Inglés "Transcription Element Search System"; <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) para ubicar los sitios consenso sobre la región promotora y de esta manera, delimitar la región de ADN a amplificar. Ambos programas emplean algoritmos que identifican secuencias de ADN a las que se pueden unir factores de transcripción por su similitud con matrices creadas a partir de secuencias de ADN conocidas a las que se unen esos mismos factores de transcripción en otros genes.

Diseño de oligonucleótidos.

Para amplificar la región promotora, se procedió al diseño de los cebadores con el programa Primer-BLAST (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y Oligo-calc (del inglés “*Oligonucleotide Properties Calculator*” <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) para determinar la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos a sintetizar.

Para YY1, la secuencia de los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes.

Sentido (F-pYY1) XhoI CCTGCTCGAG ATTGGTGT TTTATGGGGAAGTATCA

Antisentido (pYY1-R) HindIII CTAG AAGCTT CTCGATTCTCCTCTCGGCCAATC

En donde la región en verde y morado indica el sitio de restricción utilizado para la clonación sitio dirigida en el vector pGL3 el cual carece de promotor eucariótico y secuencias potenciadoras, permitiendo la máxima flexibilidad en la clonación de secuencias reguladoras putativas, la expresión de la actividad de luciferasa en células transfectadas con este plásmido depende de la inserción y orientación adecuada del promotor funcional up stream de luc + (figura 10).

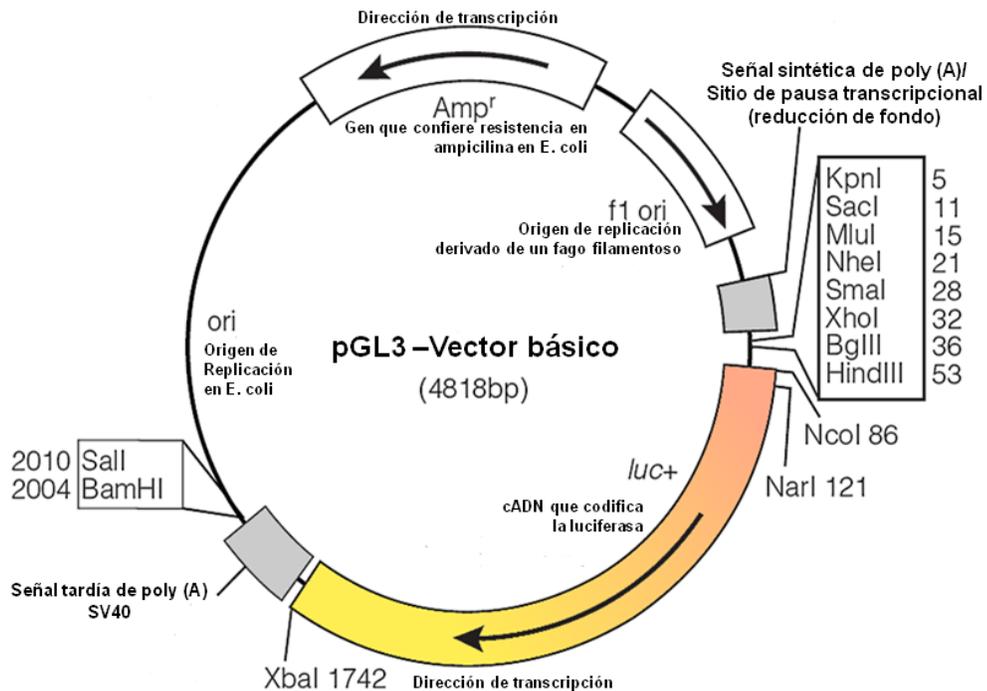


Figura 10: Mapa del vector básico pGL3. Se muestra el sitio múltiple de clonación río arriba del gen de luciferasa (*luc+*). En donde se realizara la clonación sitio dirigida del promotor YY1.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La región promotora de YY1 que fue amplificada con los oligonucleótidos específicos, abarcando 1700 pb a partir del sitio de inicio de la traducción.

Para la reacción de PCR se tomaron 5 µl de buffer de amplificación Pfx, 2 µl de la mezcla de dNTPs 10mM (0.4nM c/u), 2 µl de MgSO₄ 50mM, 4.5 µl de 100 ng de ADN, 5 µl de oligo forward (0.3µM), 2.25 µl de oligo reverse (0.3µM), 1 µl de ADN polimerasa Pfxplatinum®, a un volumen final de 50 µl con H₂O libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 95 °C/3',35 ciclos de desnaturalización a 94 °C/1', alineamiento 65 °C/1', extensión 72 °C/1'30" y una extensión final a 72 °C/5'.

Secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó utilizando 400 ng de ADN plasmídico, en presencia de 10 pg del oligonucleótido sentido y 2.5 µl de reactivo BigDye v3.1 [Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems)]. Posteriormente, la reacción de secuenciación se sometió a una desnaturalización inicial de 96 °C/1', 25 ciclos a 96 °C 10"/alineamiento 50 °C 5"/extensión 60 °C 5'.

La reacción de secuenciación se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se procedió a la precipitación con EDTA-Etanol para limpiarla. Para ello se usaron 5 µl de EDTA 125 mM pH 8 y 60 µl de ETOH absoluto. Se agitó brevemente para mezclar, y los tubos se incubaron 30'/TA. Posteriormente se centrifugó 20' a máxima velocidad. Se procedió a remover el sobrenadante y los botones se lavaron con 250 µl de Etanol al 70 % y se homogenizaron por inversión. Después se centrifugaron 5' a máxima velocidad y se volvió a retirar el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado con 250 µl de Etanol al 70 %. Posteriormente, se removió todo el sobrenadante y se dejaron secar completamente por 15'. La reacción de secuenciación fue sometida a un secuenciador automático ABI Prism 3200 (Applied Biosystems).

Construcción de plásmidos reporteros.

Para demostrar la actividad transcripcional de NF- κ B sobre el promotor de YY1, se construyó el plásmido reportero pYY1-Luc, después de clonar la región promotora de YY1. Una vez amplificado este fragmento se digirió con las enzimas *XhoI/HindIII* y se procedió a ligarlo en el vector pGL3-basic/*XhoI/HindIII*, tomando 10 μ l de Inserto (pYY1), 1 μ l de vector (pGL3-basic/*XhoI/HindIII*), 1 μ l de la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), 4 μ l de buffer y 4 μ l de H₂O libre de nucleasas. La reacción fue incubada por 18h a 4 °C.

Posterior a la incubación se procedió a la transformación de las bacterias DH5 α , mediante choque térmico a 42 °C. Las transformantes se plaquearon en platos con agar LB con ampicilina 100 μ g/ml e incubaron a 37 °C durante 16 h. Después de este tiempo, se seleccionaron 10 colonias para purificar el ADN plasmídico por el sistema comercial *PureYieldTM plasmid midiprep system*, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN plasmídico fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Transfección.

Para realizar la transfección del plásmido reportero pYY1-Luc, se cultivaron células PC3 (ATCC[®]No. Catalog CRL-1435) de cáncer de próstata. Esta línea celular se utilizó por dos razones: 1) Las células PC3 sobre expresan el factor YY1 y 2) Al ser células adherentes, su transfección es sencilla, comparado con nuestro modelo celular RS4;11, que son células que crecen en suspensión. 16 h anterior a

la transfección las células se plaquearon a una densidad de 1×10^5 células por pozo, en una placa de 24 pozos. Al día siguiente se transfectaron con 1 μg del plásmido reportero pYY1-Luc, como control negativo, el plásmido vacío pGL3-basic vector, y el plásmido pLuc-MDR1 que contiene el promotor MDR1, como control positivo (pMDR1) y 1 μl de lipofectamina 2000 (invitrogen). Las células fueron incubadas 3 h/37 °C con la mezcla de transfección (lipofectamina + DNA plásmídico). Después de la incubación, se agregó a cada pozo 800 μl de medio sin antibiótico y se dejó incubando por 24 h. Posterior a la incubación las células fueron tratadas con doxorubicina 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 6 h.

Ensayo de luciferasa.

Posteriormente a la transfección, las células fueron lavadas con PBS y se despegaron con 200 μl de buffer de lisis 1X, durante 3'. El lisado fue transferido a microtubos de 1.5 ml y centrifugarlas a 9000 rpm por 1'. Después el lisado (40 μl) nuevamente se transfirió a un tubo nuevo y se mezcló con la luciferina (70 μl) e inmediatamente se evaluó la actividad de la luciferasa por medio del luminómetro Modulus™ Luminometer (Turner BioSystems).

8. Resultados.

Evaluación de la expresión de MDR1, activación de NF- κ B y YY1, en la línea celular RS4;11.

Para evaluar la expresión de la proteína MDR1 y la activación de los factores de transcripción YY1 y NF- κ B, se realizaron ensayos de citometría de flujo, a partir de extractos de proteínas nucleares para NF- κ B y YY1 y de proteínas de células totales, para el caso de MDR1.

Con los datos obtenidos y mediante el uso del programa Prisma para Windows ver. 5.03, se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (IMF). Los resultados muestran una mayor expresión de la proteína MDR1 en las células que fueron tratadas con doxorubicina, comparadas con las células sin tratar, siendo solamente significativa a la concentración de 0.5 μ g/ml (Figura 11). De igual forma, se observó una mayor activación del factor de transcripción YY1 a una concentración de 0.5 μ g/ml, comparado con las células sin tratar (Figura 12). Para NF- κ B se observó una diferencia significativa en su activación a las concentraciones de 0.25 μ g/ml y 0.5 μ g/ml (Figura 13).

MDR1

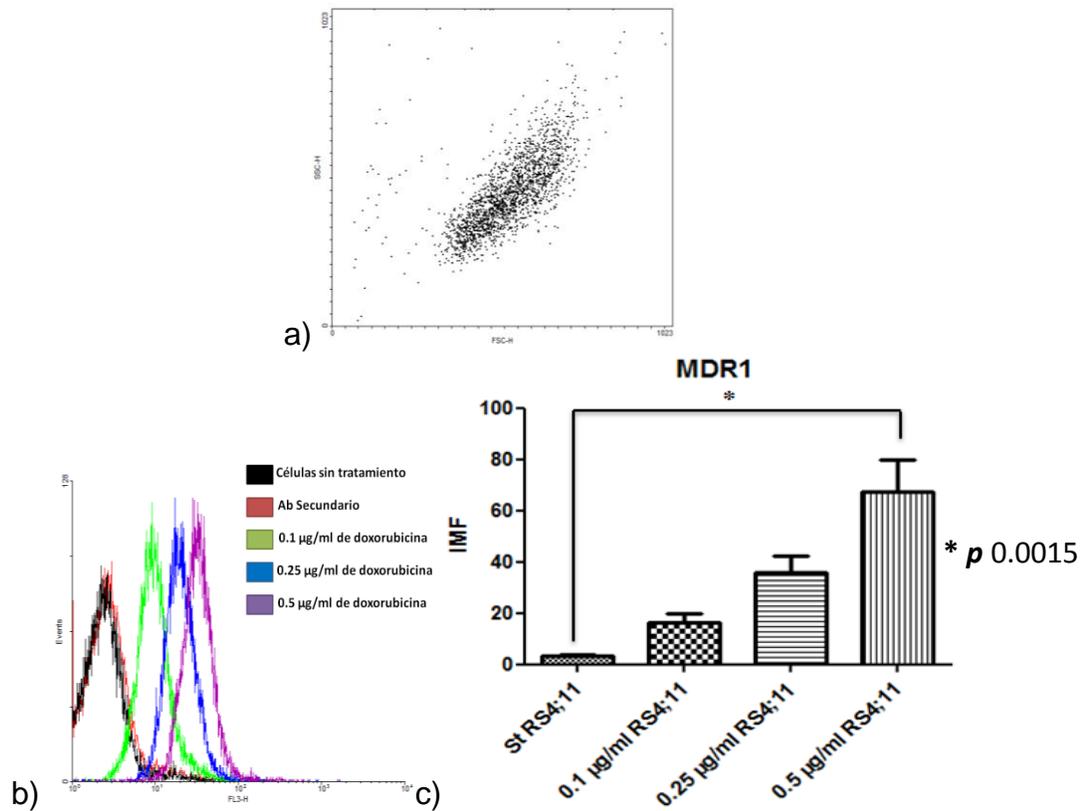


Figura 11: Expresión de la proteína MDR1 en células RS4;11 tratadas con 0.1, 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de doxorubicina durante 6 h. a) Dotplot representativo de la población de células RS4;11. b) Histograma representativo, se observa que el aumento en la expresión de gp-170 es dosis dependiente. c) Grafico representativo de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de tres experimentos, nótese que solo con 0.5 $\mu\text{g/ml}$, la expresión es significativa, con respecto a las células sin tratar.

YY1

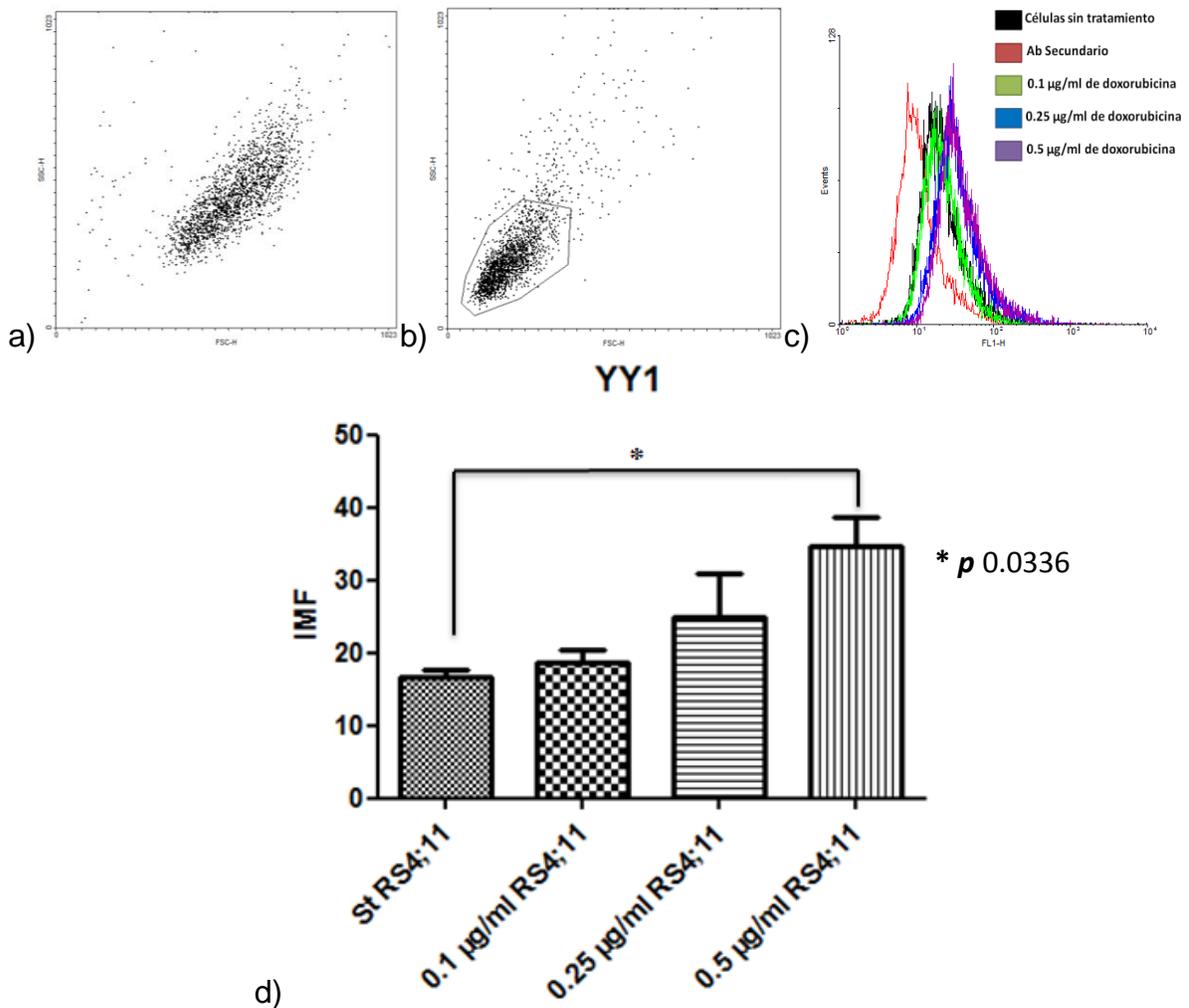


Figura 12: Activación del factor de transcripción YY1 en núcleos de células RS4;11, tratadas con 0.1, 0.25 y 0.5 µg/ml de doxorubicina, durante 6 h. a) Dotplot representativo de la población de células RS4;11. b) Dotplot representativo de la fracción de núcleos obtenidos. c) El histograma muestra que con 0.5 µg/ml, nuevamente existe una mayor detección de YY1, comparado con los núcleos sin tratamiento. d) Grafico representativo de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de tres experimentos, nótese que solo con 0.5 µg/ml, la expresión es significativa, con respecto a las células sin tratar.

NF-κB

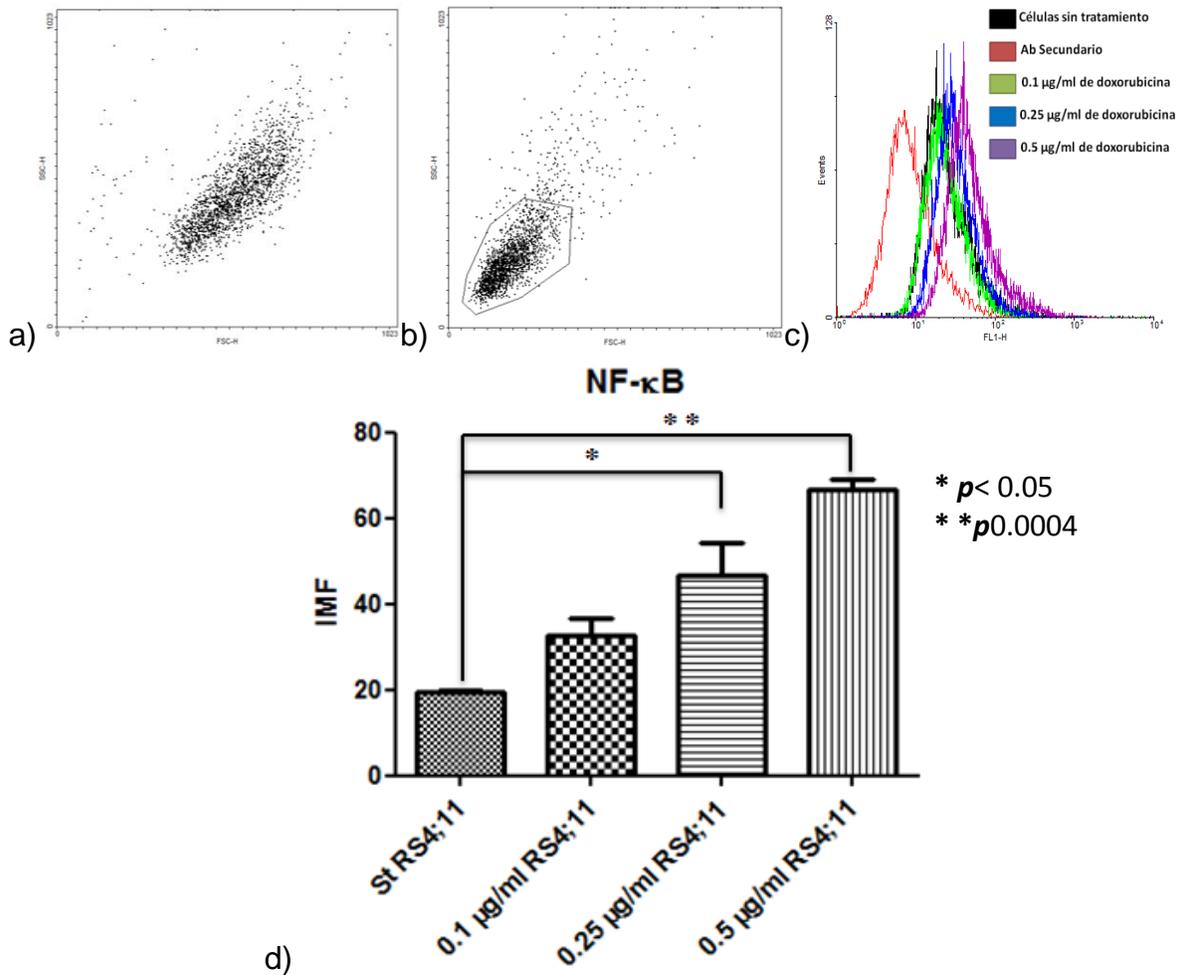


Figura 13: Translocación del factor de transcripción NF-κB. a) Dotplot representativo de la población de células RS4;11. b) Dotplot representativo de la fracción de núcleos obtenidos. c) Se observan los histogramas correspondiente a cada tratamiento, como en la figura 11 y 12 y en d) se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada tratamiento y se aprecia que 0.25 µg/ml y 0.5µg/ml de doxorubicina, hay una mayor translocación de NF-κB y que es estadísticamente significativa ($p < 0.05$ y $p = 0.0004$, respectivamente)

Evaluación de la expresión de MDR1 y translocación de los factores transcripcionales NF- κ B y YY1, en la línea celular RS4;11 y en la línea celular PC-3.

Para demostrar la expresión de la proteína MDR1 y la translocación de los factores de transcripción YY1 y NF- κ B, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, de células RS4;11 y de la línea celular PC-3. Esta última línea celular se utilizó para los ensayos de actividad de luciferasa por dos razones: 1) Las células PC3 sobreexpresan el factor YY1 y 2) Al ser células adherentes, su transfección es sencilla, comparado con nuestro modelo celular (RS4;11), que son células que crecen en suspensión.

Después de observar que 0.5 μ g/ml de doxorubicina fue la concentración a la cual se observó una mayor translocación de YY1 y NF- κ B los experimentos posteriores solo se realizaron a esa concentración (Figura 14,15 y 16).

Para la línea celular PC-3, el tratamiento con doxorubicina fue de 1.5 μ g/ml, concentración a la cual se indujo una mayor translocación del factor de transcripción NF- κ B (Figura 17).

MDR1

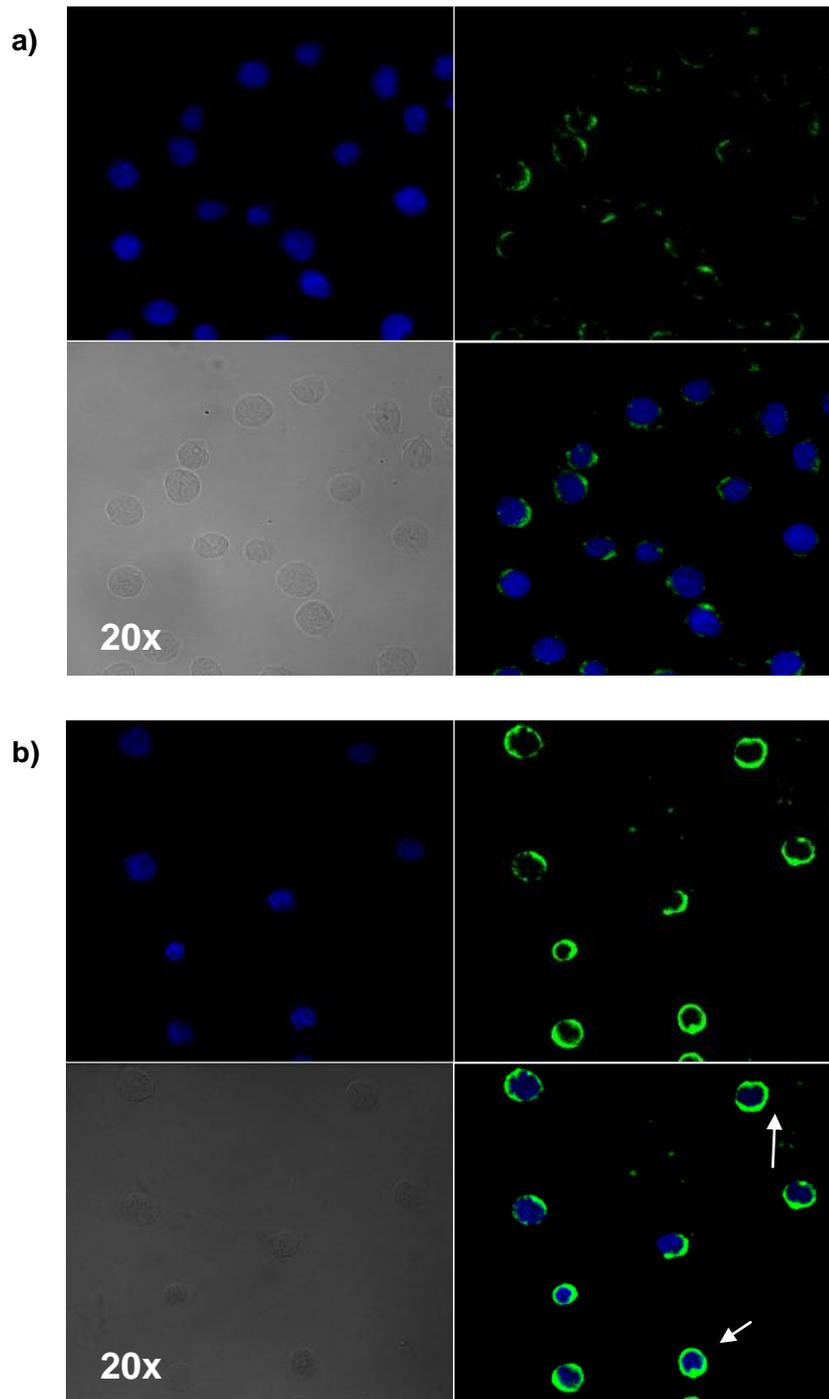


Figura 14: Evaluación de la expresión de gp-170 en células RS4;11. Los núcleos fueron marcados con DR71000 (azul) y la proteína gp-170 con FITC (verde). Nótese que hay una mayor expresión de la proteína MDR1(verde), en células tratadas con doxorubicina 0.5µg/ml por 6h (b) (flechas blancas), comparadas con las células sin tratamiento (a).

YY1

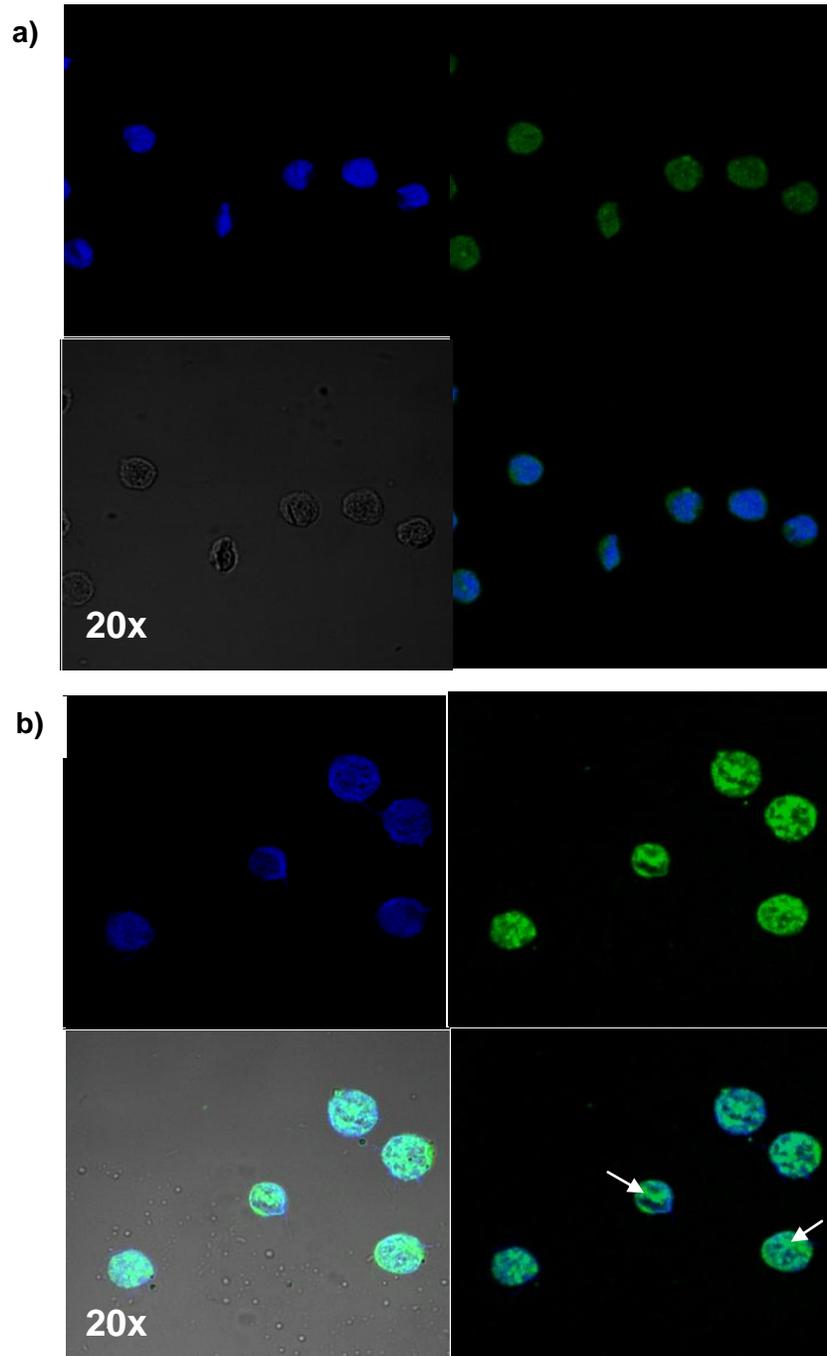


Figura 15: Evaluación de la translocación del factor de transcripción yy1 en la línea celular RS4;11. Los núcleos se marcan con DR71000 (azul) y el factor de transcripción con FITC (verde). Se observa una mayor translocación en las células tratadas con 0.5 µg/ml (b) (flechas blancas) comparados con las células sin tratamiento. (a).

NF-κB

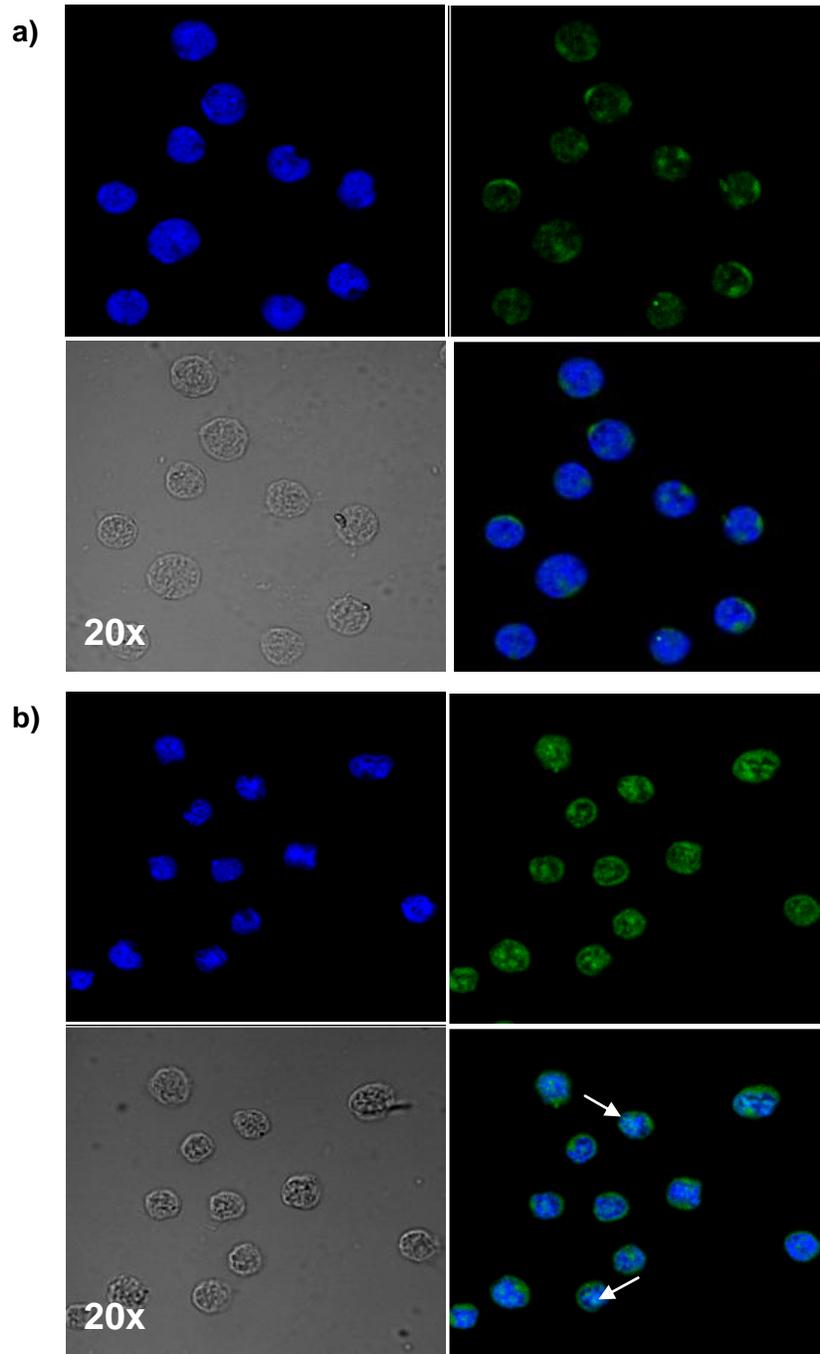


Figura 16: Evaluación de la translocación del factor de transcripción NF-κB en la línea celular RS4;11. Los núcleos se marcan con DR71000 (azul) y el factor de transcripción NF-κB con FITC (verde). Al igual que con YY1, se observa una mayor translocación en las células tratadas con 0.5µg/ml (b) (flechas blancas) comparadas con las células sin tratamiento. (a).

Células PC-3.

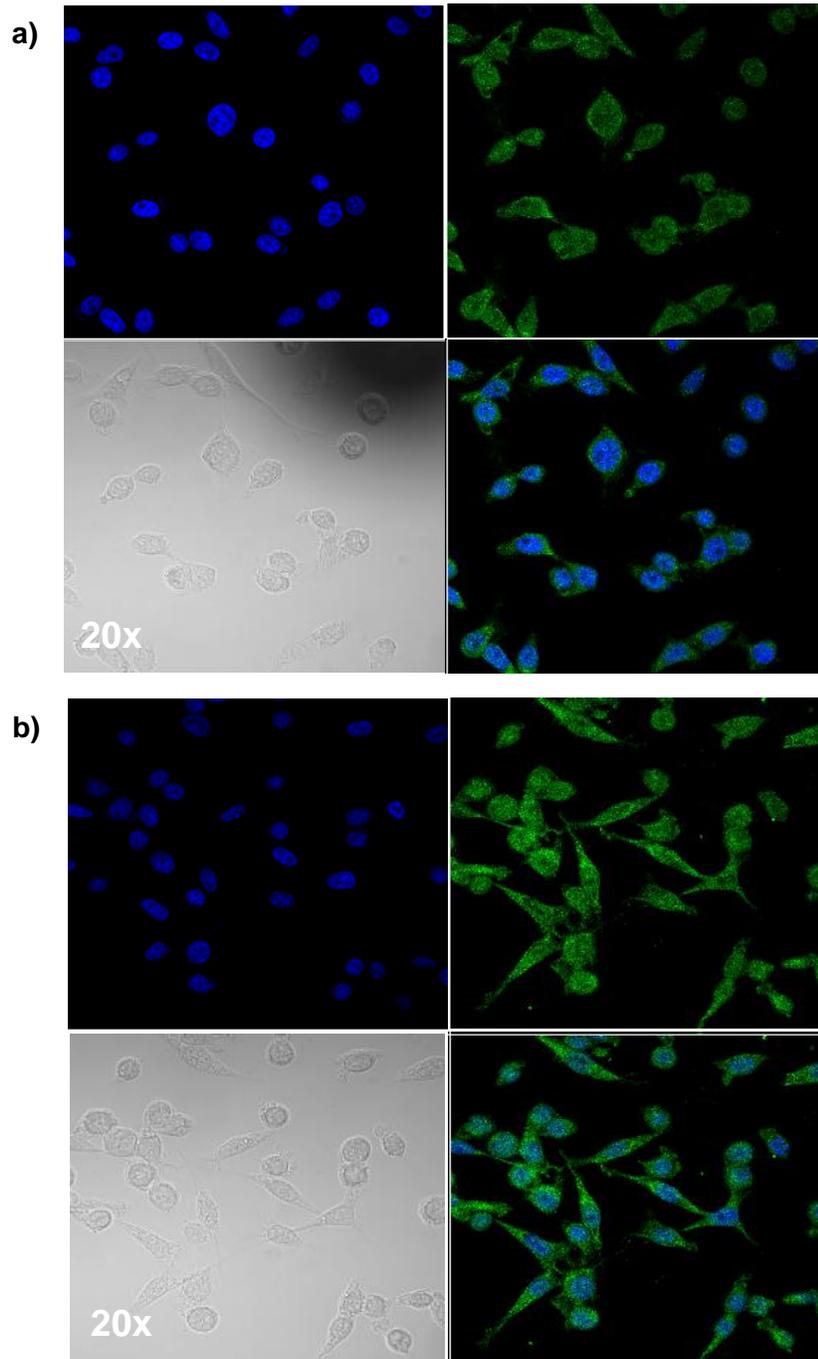


Figura 17: Evaluación de la translocación de NF- κ B en la línea celular PC-3. Los núcleos se marcan con DR71000 (azul) y el factor de transcripción NF- κ B con FITC (verde). Se observa la translocación en las células tratadas a una concentración de 1.5 μ g/ml), comparadas con las células sin tratamiento a).

Análisis informático de la región promotora de YY1.

A partir del sitio de inicio de la traducción, se analizó una región de aproximadamente 1700 pb, con la finalidad de analizar si esta secuencia correspondía o no a una región promotora. Esta región fue analizada con las herramientas bioinformáticas Genomatix y TESS, con lo que se pudo identificar un sitio de unión para el factor de transcripción NF- κ B (figura 18).

```
TTGGTGTTTATGGGGAAGTATCAACTACTTGCAGTGCCATTTCCCCATCAATTACTAGAGAGTGGGAAAAGTGAAATTTAAAAAGCATTAAGA
CATGTAAAAGTTCTCCACAACCTGGTTTCCATTCATGAAATATTTATGCAGAGTTTATAAGCTATAAAGCCAGAGATGACTTAATCAACAG
ATTTGACTTTTCCAAACTGAGTGGGTGCAGTACTCCAAGGGGAATTTATTCAGGTTTCAAAGCTCAGATTCAAAGAGAAAACGATCTAATTTG
TCACTCCTTACACTAATATTCTCAAAGTCAAGTCCAATCGGATTTAGCAATAAGAAGGGACTAGGATTTATAAAGTTGCCTTTTAAATGAGA
ATGTATAGTCTACTTGTTTTAAACAAGTTGAGCCTAAGATTAAATGATATGCGTACAGTTCAGAAAATCATGGGCCTCAACTGCATGAACACTA
TTACAAAACAGTAAATGTTGATAATATTTAAGTTGAACAAATTCACAGAGGCGTTAAATCGGCCAAACGAGTACAACAAAGACACACCTTTC
CAACTCTTCAATTTGTCATAGTTTCCCTTAAAAATCAGGAAATCTTTGTTTGGCTTTAAGGCAAATTTGT CAGGCAAAAAGGACAGATAAGAGCA
GAAACACTTCGCTGCAATGTAACCTATTTCAGGAAGGTTTAACTTGCCTGCTATCCGTGCCACAAAAAAAATCTAGGCTCTGTTGCAGGTACA
ATGGAGGACACGGCTGAAAAAATTTGGAATTTTAAATGAGACAAATGCAAAAACCTGGTGGCGTAAAAAGGAGCACCTATGAAAGTGACAAA
TAGGGGGAAAGGTTGGGCAAGGAAACAATGGCTGACTGGAGAGCAAAGAAGGGGAAGCTCAGGAGAAAATTTTAGAAAGCCGCCAGGACCC
TG TAGTTCTAAGATCTACGGGAAACAGGCACCCAACGGCTGCGTCTCAGGTTTCCGCGGTCACTAAAGAATAACGGACATCCTCCCAACG
GTGGCCCTGGGGCTCCCGGGCGCTTCCGCGGAGCTCGCGCCGACCCCGCGCTCGGCCCCGCACCCCGCCGGCGCTCGCGGCAGATACCG
GACGCTGCCCGCTCGCCCGATTTTGTCCGTTCCGTCCTCCCACTCACCCCGCGGCCATCGCTCGCCCGAAGCCAGGCGACAAGAACAAC
ACCTCCCGACCGGAAAAGGAAAGCACAGGCATTTCTCGTCAAAGCAGACTTTTATGGGGCGACAGGGCCGCCCGCACGCGCCAGCCGCTCC
CCGCGCGCCCCCGGGCCGCCACCCGCTCAACCCCGCTCCCGCGCGGCCCTCCCTCCCTTCTCCTCAGGCTCCCGCCCGCTGGTGGCC
GGGGCCGCGCGACCGCTCACCGGCTCCCAAGGCAGCGCTGTAGCGCGACGCCCGTTCCCGAGTGCAGCCCGCGCCGAGGCGCGGGT
TTTGTGGCTGTTGCACCGCAAGGGCGGCAGCCGCGCACCCGGGAAGCGGGAGGCGGTGGCGGCGCGGCGCGCGCTGACGTACGCGC
CGGGGCCAGCCAGGGCGCGTGCAGCCGCCCGCCCGCGTCCCATCGGCCCAATCCGGGAGGAGCCCGCGAGTGGGCGGGCCCGCGGA
GGCCAGCGACAGATCGATTGGCCGAGAGGAGAATCGAGGGGCGAACGGCGAGTGGCAGCGAGGCGGGGCGGGCTGAGGCCAGCGGGAAGT
CTCGCGAGGCCCGGGCCGAGCAGAGTGTGGCGCGCGCGCGAGATCTGGGCTCGGGTTGAGGAGTTGGTATTTTGTGTGGAAGGAGGCGGAGGCG
CAGGAGGAGGGGGAAGCGGAGCGCCGGCCCGAGGGCGGGAGGAGCGCGCCAGGGCGGGCGGTTGCGGCGAGGCGAGGCGAGGCGGGGAG
CCGAGACGAGCAGCGGCCGAGCGCGGGCGCGGGCGCACCGAGGCGAGGGAGGCGGGGAAGCCCGCGCGCGCGCGCGCCCGCCCTTCC
CCCGCGCCCGCCCTCTCCCCCGCGCTCGCCGCTTCTCCTCTGCTTCTTCCACGGCCGGCGCTCTCGCCCGCGCGCGCGCAGCCG
AGGAGCCGAGGCCCGCGCGCTGGCGCGGAGCCCTCAGCC +1 ATG →
```

Figura 18: Secuencia del promotor de YY1 (1701pb letras negras). La región de color verde indica el sitio de unión del factor de transcripción NF- κ B a -652 pb del sitio de inicio de la transcripción (letras rojas).

Amplificación y clonación del promotor YY1.

El promotor YY1 se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos, que permitieron su clonación sitio dirigida en el vector pGL3basic-*Xho*//*Hind*III. Posteriormente, las clonas recombinantes fueron analizadas por restricción enzimática *Xho*//*Hind*III y la integridad de la secuencia fue verificada por secuenciación automática (figura 19 y 20)

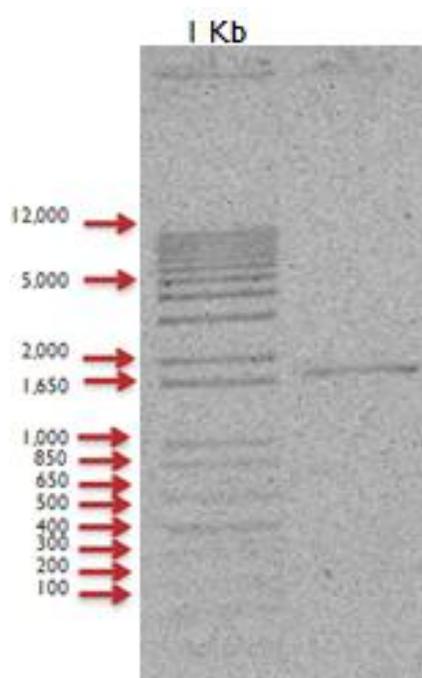


Figura 19: Gel de agarosa al 1%, donde se observa la banda de ~1700 pb, correspondiente a la región promotora de YY1.

Construcción del plásmido reportero pYY1-Luc.

Con el propósito de evaluar la actividad del promotor de YY1 se realizó la construcción del plásmido reportero pYY1-Luc, mediante restricciones enzimáticas HindII/XhoI del promotor de YY1 para posteriormente ligarlo en el vector pGL3-basic vector. (Figura 21).

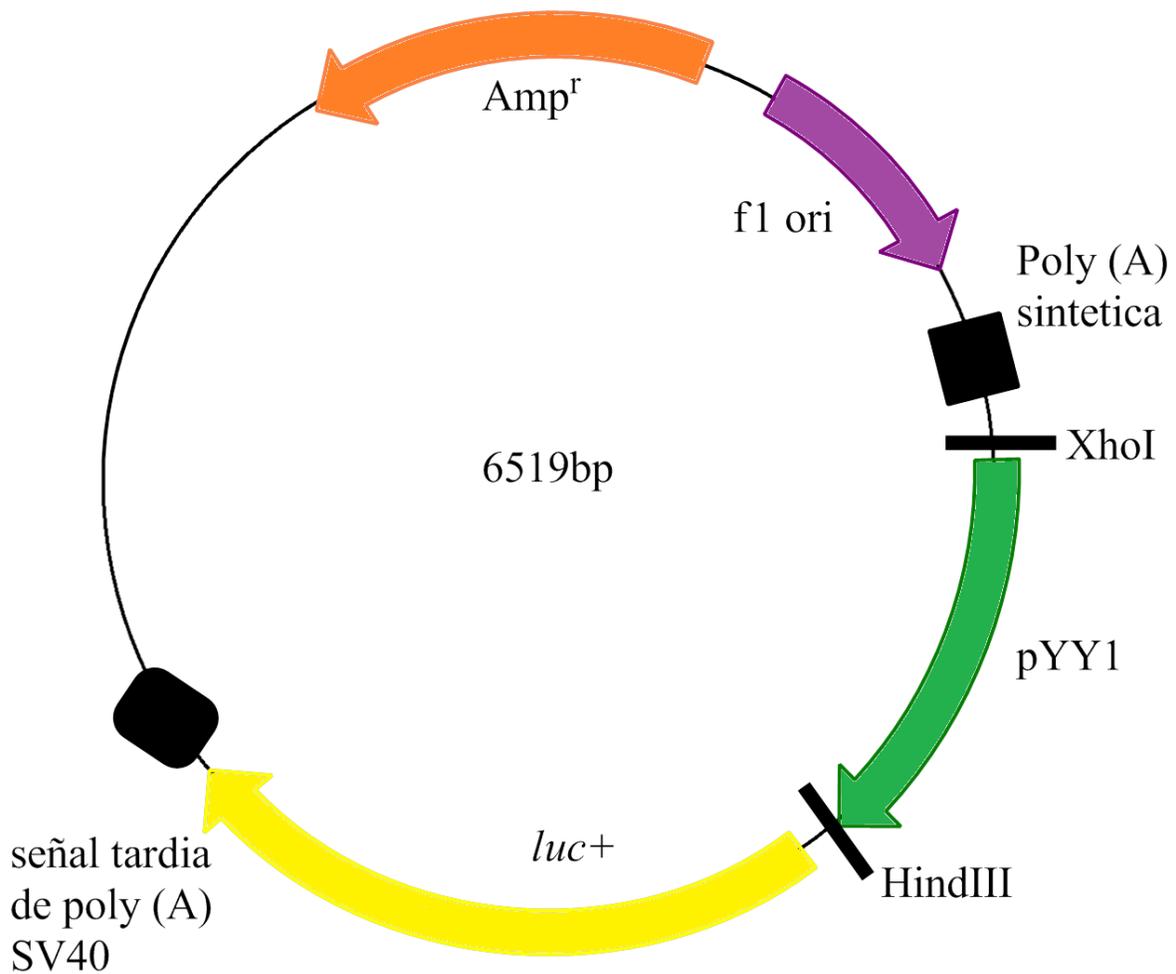


Figura 21: Representación esquemática del mapa del plásmido reportero pYY1-Luc. La secuencia del promotor de YY1 1701pb (verde) se clonó río arriba del gen reportero de luciferasa (amarillo).

Evaluación de la actividad del promotor YY1 células PC-3 con y sin tratamiento de doxorubicina mediante ensayos de luciferasa.

Para evaluar la actividad promotor de YY1 (pYY1-Luc) y determinar si existe una interacción con el factor de transcripción NF- κ B, se realizaron ensayos de luciferasa en células PC-3 con y sin tratamiento de doxorubicina.

Se puede observar que pYY1-Luc muestra un aumento en actividad de la luciferasa comparado con el plásmido vacío (pGL3) y las células no transfectadas, además de mostrar mayor actividad que el promotor de MDR1 (pMDR1).

El tratamiento de 0.5 μ g/ml de doxorubicina a 6 h, no produce ningún cambio significativo en la actividad del promotor de YY1 (pYY1-Luc) ni en la actividad del promotor de MDR1 (pMDR1-Luc) en las células PC-3 (figura 22).

Evaluación de la actividad transcripcional de NF- κ B sobre el promotor de YY1

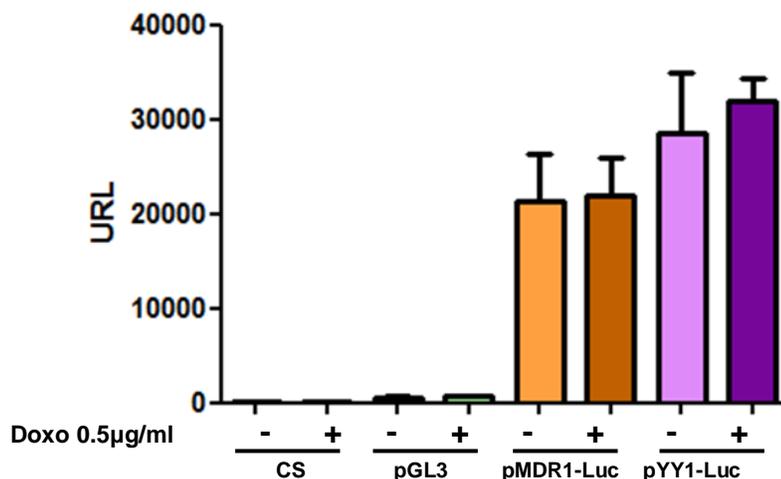


Figura 22: Evaluación de la actividad transcripcional de NF- κ B sobre el promotor de YY1 en la línea celular PC-3. Se observa que el promotor de YY1 (pYY1-Luc) induce una mayor actividad que el promotor de MDR1 (pMDR1-Luc) y el plásmido vacío (pGL3), además de que el tratamiento de 0.5 μ g/ml no produce un cambio significativo en la actividad de los promotores.

Dado que en la línea celular PC-3 no se observó la translocación del factor de transcripción NF-κB al ser tratada con de 0.5µg/ml de doxorubicina, se procedió a evaluar la actividad del promotor con 1.5 y 2.5 µg/ml de doxorubicina, donde se pudo apreciar la translocación del factor de transcripción NF-κB en los ensayos previos de inmunofluorescencia (figura 17).

Se observó que la actividad del promotor de YY1 (pYY1-Luc) es disminuida por el tratamiento de 1.5 y 2.5µg/ml de doxorubicina, comparado con las células que contenían el promotor de YY1 y no fueron tratadas (Figura 23). Se observó la misma tendencia en el promotor de MDR1 (pMDR1-Luc) a la concentración de 1.5µg/ml de doxorubicina comparado con las células que contenían el promotor de MDR1 sin tratamiento.

Evaluación de la actividad transcripcional de NF-κB sobre el promotor de YY1

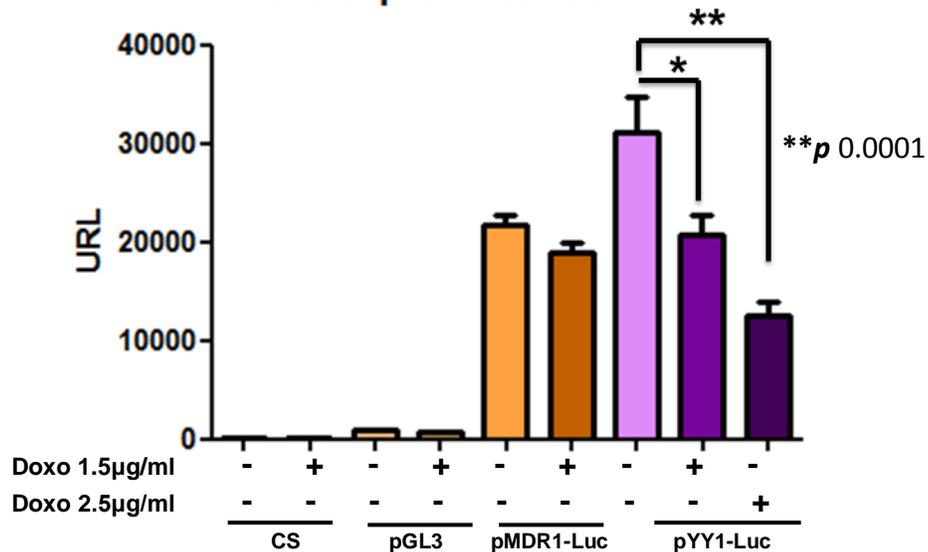


Figura 23: Evaluación de la actividad transcripcional de NF-κB sobre la región promotora de YY1 en la línea celular PC-3. Se puede observar que a las concentraciones de 1.5 y 2.5µg/ml, la actividad del promotor de YY1 (pYY1-Luc) es significativamente disminuida, comparada con las células con el promotor de YY1 pero sin el tratamiento de doxorubicina.

9. Discusión.

La quimioterapia es el tratamiento más empleado para cánceres hematopoyéticos y para la mayoría de tumores sólidos. La mayor parte de los cánceres son inicialmente sensibles a la quimioterapia, sin embargo, algunos desarrollan resistencia, permitiendo que la enfermedad persista a través de la expansión de células cancerígenas con fenotipo MDR. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos responsables del desarrollo de MDR y la posibilidad de revertir el fenotipo de resistencia es una prioridad en la investigación de la quimioterapia contra el cáncer [58].

El problema de la resistencia a la quimioterapia es multifactorial y por ello muy complejo. Resulta claro que las células neoplásicas, ante el reto de moléculas tóxicas, son capaces de desencadenar mecanismos biomoleculares que las hacen resistentes a los efectos lesivos de la mayoría de los oncofármacos, siendo difícil predecir su comportamiento únicamente con la determinación de las proteínas responsables [14].

Los factores de transcripción (FT) se han visto involucrados en el desarrollo del cáncer y la quimiorresistencia, ya que son los puntos finales de la regulación de las vías de señalización. Estos FT funcionan como oncogenes o supresores de tumores en diversos cánceres, en los cuales se encuentran con frecuencia sobreexpresados, determinando así los resultados clínicos en pacientes con cáncer [59]. Por ejemplo, se sabe que el promotor de gp-170 presenta sitios de unión para FT en los que se incluyen SP1, NF- κ B, YB-1, MEF-1 y FOXO3a. La sobreexpresión de NF- κ B, YB-1, FOXO3a y NF- κ B incrementa la expresión de

gp-170 en presencia de doxorubicina, promoviendo la resistencia a fármacos y la supervivencia de las células [32] [35].

El Proyecto Genoma Humano ha estimado que más de 3.000 factores de transcripción existen y muchos de ellos se espera que participen en el desarrollo de cáncer, por lo que es importante desarrollar una estrategia para identificar fácilmente los factores de transcripción oncogénicos, como posibles dianas terapéuticas [59].

Estudios anteriores establecieron que la inhibición de la actividad de NF- κ B sensibiliza a las células resistentes de cáncer de colon a la daunomicina (un antineoplásico muy similar a la doxorubicina), a través de una disminución de la expresión del gp-170, concluyendo que la activación de NF- κ B actúa río arriba, controlando el flujo de drogas a través de la expresión de gp-170, en células MCF7. [44] Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual NF- κ B regula la expresión de gp-170 se desconoce.

Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se determinó que el promotor de *mdr1* contiene sitios específicos de unión para YY1 y que este factor transcripcional regula directamente la expresión de gp-170, a través de la activación de su promotor. Lo anterior fue determinado utilizando plásmidos reporteros. Sin embargo, hasta el momento, no existen reportes que involucren la acción de agentes antineoplásicos en el desarrollo de la resistencia a fármacos, a través del factor transcripcional YY1, ni tampoco está claro quién podría regular a YY1 después de este estímulo [37].

Dado que la quimioterapia es actualmente el tratamiento más utilizado para los pacientes con leucemia, hemos explorado la participación de los factores de transcripción YY1 y NF- κ B en el desarrollo de la quimiorresistencia. Usando como modelo la línea celular RS4;11 de leucemia linfoblástica aguda, se determinó que el tratamiento con doxorubicina 0.5 μ g/ml, induce una mayor expresión de la proteína gp-170. De igual forma, se observó un aumento en los niveles de YY1 y NF- κ B nucleares (Figura 11 a 17), lo que sugiere que el incremento en la actividad de los factores de transcripción NF- κ B y YY1, podría estar regulando de manera transcripcional, la expresión de la proteína gp-170.

Para determinar el mecanismo a través del cual la doxorubicina induce la expresión de gp-170, se analizó la región promotora de YY1 revelando un sitio de unión para el factor NF- κ B, en la posición -652 del inicio de transcripción (figura 18). Un fragmento de 1701pb fue amplificado, clonado y secuenciado (figura 19 y 20) para generar la construcción de plásmido reportero pYY1-Luc. Posteriormente al evaluar el promotor YY1, se observó un aumento en la actividad de luciferasa, lo que sugiere una actividad transcripcional de la región promotora que fue clonada (pYY1-Luc). De manera simultánea, se utilizó como control positivo, un plásmido reportero con una región promotora del gen *mdr1* (generado previamente por nuestro grupo de trabajo) e interesantemente, se observó que con el promotor de YY1, hubo una mayor actividad de luciferasa, comparado con el promotor de MDR1. (Figura 22).

Los resultados de los ensayos de luciferasa en células PC-3, proveen evidencia indirecta de que la actividad del promotor de YY1 es regulada por el factor de

transcripción NF- κ B, el cual fue activado por el tratamiento con doxorubicina a una concentración de 1.5 μ g/ml (Figura 17). Contrariamente a lo esperado, se observó una disminución en la actividad del promotor YY1, sugiriendo que la administración de doxorubicina está afectando la regulación de NF- κ B sobre el promotor YY1 (Figura 22 y 23).

Es posible que la inactivación de NF- κ B en células PC-3 esté dada por la expresión de proteínas que interactúan con NF- κ B, lo que evitaría su actividad transcripcional sobre el promotor de YY1. Ananthi J. *et al.* mostraron que las células de cáncer de próstata PC-3 expresan las proteínas inhibitoras de diferenciación Id1 e Id2, las cuales están altamente expresadas y son fuertes marcadores pronósticos del cáncer de próstata. Estas proteínas contienen un dominio HLH (del inglés “*Helix-Loop-Helix*”), y no cuentan con el dominio básico de unión al ADN. Las proteínas Id, por tanto, pueden regular la actividad promotora de los genes dependientes de la caja E (CANNTG), que es el elemento al cual se unen heterodímeros u homodímeros de factores de transcripción, con dominio básico de HLH (del inglés “*Basic Helix-Loop-Helix*”) [60].

Existen cuatro isoformas diferentes de Id: Id1, Id2, Id3 e Id4, las cuales tienen un dominio altamente conservado HLH, pero divergen en los dominios N- y C-terminal [61].

Los factores de transcripción HLH están presentes en la mayoría de organismos eucariotas y tienen un papel importante en muchos procesos esenciales de desarrollo, la regulación del crecimiento celular y la diferenciación de los distintos

tipos de células [62]. El dominio HLH regula la homo y heterodimerización, además de contener una porción de restos de aminoácidos básicos, que constituyen un motivo bHLH, a través del cual pueden unirse a las secuencias E-box (CANNTG), en diversos promotores. Existen dos clases distintas de proteínas bHLH, la clase A, también conocidas como proteínas "E", que consisten de E2-2, HEB y los productos diferencialmente empalmados del gen E2A, E12 y E47. Las proteínas de la clase B, cuya expresión está regulada durante el desarrollo, comprenden MyoD, NeuroD, y TAL1 [61].

Se ha descrito que las proteínas Id interactúan con factores de transcripción con dominio bHLH de clase A y B, dentro de los cuales el factor E2A posee una mayor interacción. Además de interactuar con factores de transcripción, también interactúan con proteínas sin dominio HLH, como la proteína de retinoblastoma (Rb), proteínas con dominio Ets (ELK1) y proteínas que poseen el homeodominio Pax [61].

Masahiko K, *et al.*, demostraron que el tratamiento con doxorubicina induce la expresión del gen Id2, el cual reprime la expresión de genes específicos de músculo, mediante la inhibición de la función de MyoD, para transactivar sus genes diana. Además, los autores evidenciaron el mecanismo por el cual la doxorubicina regula la expresión del gen Id2A, a nivel transcripcional, ya que observaron que la doxorubicina se une a 1.3 kb de la secuencia que flanquea el 5' del gen Id2A, misma que contiene elementos regulatorios capaces de mediar la respuesta a éste fármaco [63].

La inducción de la proteína Id2A, promueve la interacción con la proteína E2A, formando heterodímeros no funcionales que antagonizan la transcripción de genes dependiente de la transcripción de E2A. Esta interacción tiene una función importante en la regulación de la expresión de genes diana.

Dados los antecedentes anteriores se sugiere que la regulación del promotor YY1 puede ser afectada por la formación de este complejo inducido por doxorubicina en la línea celular PC-3, en donde Id2A podría estar interactuando con el factor de transcripción NF- κ B, ya que en reportes anteriores se ha descrito que estas proteínas Id2A y E2A afectan la regulación de la transcripción de los genes blanco al interactuar con distintos factores de transcripción con dominio bHLH y sin él.

Por lo que en este trabajo se propone que la regulación del factor de transcripción NF- κ B está siendo afectada por la formación del heterodímero Id2/E2A, el cual podría estar interactuando con las subunidades de NF- κ B, impidiendo así la regulación transcripcional del promotor de YY1 que pretendimos evaluar. Lo anterior podría explicar el porqué se observa una disminución en la actividad del promotor de YY1 en células PC-3 tratadas con doxorubicina 1.5 y 2.5 μ g/ml y que además es un efecto dosis-dependiente, ya que mientras más doxorubicina se adicionó, menor actividad transcripcional se observó. Este mismo comportamiento fue visto al utilizar el promotor de MDR1, que inicialmente se usó como control positivo, lo cual sugiere que es un mecanismo “universal”, para cualquier promotor, en presencia de doxorubicina.

Wa Chi Ho *et al.* observaron que el tratamiento con doxorubicina induce la activación de p65 (RelA) actuando como represor transcripcional en la línea celular HEK293, concluyendo que las modificaciones post-transcripcionales determinan el papel de represor o activador de p65. [64]. Es posible que la disminución observada en la actividad del promotor de YY1 en células PC-3 tratadas con doxorubicina este determinada por lo descrito anteriormente. Pero existen diferentes evidencias que contradicen lo observado por Wa Chi Ho *et al.*, la primera es lo descrito por Rosaline C-Y. *et al.* donde observan que el tratamiento con doxorubicina induce la activación de Foxo3a (un factor de transcripción implicado en la vía de activación de NF- κ B) induciendo la expresión del gen de multirresistencia a fármacos *mdr1* en la línea celular de leucemia K562 [35]. Segundo el tratamiento con daunomicina (el análogo a doxorubicina) activa a NF- κ B induciendo la expresión del gen *mdr1* en células de cáncer de colon [65]. Tercero varios estudios previos han demostrado que los inhibidores quimioterapéuticos de la topoisomerasa que incluyen la doxorubicina, etopósido, camptotecina actúan como potentes inductores de la ruta de NF- κ B. La observación de que estos compuestos activan la vía e inducen a NF- κ B, que es competente para unirse al ADN, ha dado lugar al concepto de que estos fármacos inducen eventos transcripcionales, activando de genes antiapoptóticos que puede contribuir a la resistencia a la quimioterapia.

Por lo que esta información debe ser tomada en cuenta para los siguientes experimentos a realizar.

Para resolver lo anterior, se propone realizar nuevos ensayos de luciferasa, en una la línea celular HEK293 y evaluar nuevamente la actividad del promotor de YY1. En esta línea celular usada como modelo, se espera que el tratamiento con doxorubicina 1.5 $\mu\text{g/ml}$ incremente la actividad del promotor de YY1, al aumentar la activación de NF- κ B observada por ensayos de citometría e inmunofluorescencia. Lo ideal sería poder evaluar la actividad de luciferasa directamente en nuestro modelo de estudio (células leucémicas RS4;11). Sin embargo, la transfección en este tipo celular es muy difícil por lipofección, por lo que son necesarias otras estrategias de transfección como la electroporación o sistemas de transducción. Esta última aproximación debe tomarse con cautela, ya que el manejo de agentes virales para evaluar la actividad de luciferasa ha sido poco explorado y requiere un manejo controlado. De esta forma, lo más factible es utilizar células adherentes que sean altamente transfectables (HEK-293 o COS-7). Si el tratamiento en la línea celular HEK292 fuera el observado en la línea PC-3, se concluiría que el factor de transcripción NF- κ B regula de manera negativa al promotor de YY1, aunque es necesario realizar más experimentos para determinar el papel de NF- κ B en la quimiorresistencia.

10. Conclusiones.

- Se demostró por primera vez que el tratamiento con doxorubicina 0.5µg/ml, induce la activación de los factores de transcripción YY1 y NF-κB y de manera simultánea induce la expresión de la proteína gp-170, en la línea celular de leucemia linfoblástica aguda (RS4;11). Lo anterior sugiere la participación de los factores de transcripción YY1 y NF-κB en el desarrollo de quimiorresistencia.
- La región de 1701pb que fue clonada en el vector pGL3-basic, es una región promotora que dirige la expresión del gen de luciferasa, cuya actividad es más fuerte que la del promotor de MDR1 de 2000pb, previamente clonado en el mismo vector.

11. Perspectivas.

- Evaluar la actividad de NF- κ B y YY1, además de la expresión de gp-170 en células RS4;11 con y sin tratamiento con doxorubicina, además de un tratamiento, ya sea con un inhibidor de NF- κ B (Bay 11-7082) o con un activador de la vía NF- κ B (Lipopolisacárido o LPS). Lo anterior será con la finalidad de modular la vía NF- κ B y evaluar su efecto sobre la expresión de Pgp-170.
- Evaluar la funcionalidad de Pgp-170, después del tratamiento con rodamina 123, un sustrato de esta glicoproteína y medir su liberación. El tratamiento con inhibidor de esta bomba (Verapamil), permitirá revertir esta funcionalidad.

12. Bibliografía.

1. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, Robison LL, Ross JA (2003) Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer* 97: 2229-2235.
2. Mejía-Arangurú JM, Ortega-Alvarez MC, Fajardo-Gutiérrez A. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. *Rev Med IMSS* 2005, 43:323-333.
3. Base de datos de cáncer 2007-2008. Dirección de Prevención y Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia-CeNSIA. Unidades Médicas Acreditadas. Secretaría de Salud
4. Medina-Sanson A, Martínez-Avalos A, Gallegos-Castorena S, et al. Pediatric oncology at Hospital Infantil de México: fiftyfive years of accomplishment. *Pediatr Hematol Oncol* 2002 Sep;19(6):383-7.
5. Dirección General de Información en Salud. Estadísticas de salud en niños y adolescentes. México, D.F.: Bol Med Hosp Infant Mex; 2004. Report No.: 4.
6. Rosell, Marco y Renau. "Leucemias". Servicio de hematología H. U. Dr Peset. Valencia. 2008
7. Lassaletta Atienza A. Leucemias-Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integral* 2004; 8(5): 435-42
8. Angel Correa RD. Estimación del porcentaje de linfoblastos para diagnóstico precoz de leucemia haciendo uso de técnicas de visión artificial. Universidad Cooperativa de Colombia, Bogotá D.C; 2010.
9. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernaldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, et al. (2011) Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 11: 355.
10. Greaves MF (1997) Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 349: 344-349.
11. Graux C (2011) Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfus Apher Sci* 44: 183-189.
12. Cáceres-Cortés J. R. Mecanismos de resistencia a drogas en malignidades hematológicas. *Rev. Ciencia Básica en Hematología; Gac Méd Méx.* 2000
13. Greaves MF, Wiemels J (2003) Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 3: 639-649.
14. Sánchez-Suárez P. y Benítez-Bribiesca L. Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. *Cancerología* 1. 2006: 187-199.
15. Lehnert M (1996) Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer* 32A: 912-920.
16. Tan B, Piwnicka-Worms D, Ratner L (2000) Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol* 12: 450-458.
17. Dano K (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 323: 466-483.
18. Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152-162.
19. Kartner N, Riordan JR, Ling V (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221: 1285-1288.
20. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, et al. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654.
21. Ueda K (2011) ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 401-409.

22. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22: 7468-7485.
23. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, et al. (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323: 1718-1722.
24. Haber D. H. Multidrug Resistance (MDR1) in Leukemia: Is it Time to Test? *Blood*, 1992: pp 295-298 1992
25. Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Tanaka K, Yasuhara M, et al. (1993) Digoxin-cyclosporin A interaction: modulation of the multidrug transporter P-glycoprotein in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 1614-1619.
26. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ (2005) Characterization of the human MDR1 gene. *AAPS J* 7: E1-5.
27. Higgins CF (2007) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446: 749-757.
28. Scotto KW (2003) Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 22: 7496-7511.
29. Lodish H, Berk A, Matsudaria P, Kaiser C.A, Krieger M, Scott M.P, Zlpursky L. S, Darnell J. *Biologia Celular y Molecular. 5a edición Editorial Medica Panamericana, 2005. 1088p.*
30. Latchman DS (1997) Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1305-1312.
31. Smale ST, Baltimore D. The "initiator" as a trascription control element. *Cell* 1989;57:103-13
32. Hu Z, Jin S, Scotto KW (2000) Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J Biol Chem* 275: 2979-2985.
33. Labialle S, Gayet L, Marthinet E, Rigal D, Baggetto LG (2002) Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol* 64: 943-948.
34. Weiss R B "The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?" *Seminars in Oncology* 1992. (6): 670–86.
35. Hui RC, Francis RE, Guest SK, Costa JR, Gomes AR, et al. (2008) Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 7: 670-678.
36. Shen H, Xu W, Luo W, Zhou L, Yong W, Chen F, Wu C, Chen Q, Han X. Upregulation of mdr1 gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma. *Exp Hematol*. 2011.
37. Antonio, A.G., 2011. Manuscrito en revisión.
38. Yao YL, Dupont BR, Ghosh S, Fang Y, Leach RJ, et al. (1998) Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1. *Nucleic Acids Res* 26: 3776-3783.
39. Freemont PS, Lane AN, Sanderson MR (1991) Structural aspects of protein-DNA recognition. *Biochem J* 278 (Pt 1): 1-23.
40. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25: 1125-1142.
41. Hyde-DeRuyscher RP, Jennings E, Shenk T (1995) DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. *Nucleic Acids Res* 23: 4457-4465.
42. Huerta-Yepep S, Vega M, Garban H, Bonavida B (2006) Involvement of the TNF-alpha autocrine-paracrine loop, via NF-kappaB and YY1, in the regulation of tumor cell resistance to Fas-induced apoptosis. *Clin Immunol* 120: 297-309.
43. Baltimore, D. and A.A. Beg, DNA-binding proteins. A butterfly flutters by. *Nature*, 1995. 373(6512): p. 287-8.
44. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene*. 2003; 22(1):90-7.

45. Gilmore T D y Ip Tony. Signal Transduction Pathways in Development and Immunity: NFκB/Rel Pathways. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2009 Ltd. www.els.net
46. Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344-362.
47. Huxford T, Ghosh G (2009) A structural guide to proteins of the NF-kappaB signaling module. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a000075.
48. Groves MR, Barford D (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol* 9: 383-389.
49. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 49-62.
50. Perkins ND (2012) The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 12: 121-132.
51. Michel F, Soler-Lopez M, Petosa C, Cramer P, Siebenlist U, et al. (2001) Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: a unique member of the IkappaB protein family. *EMBO J* 20: 6180-6190.
52. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. 1997. A cytokine-responsive IκB kinase that activates the transcription factor NF-κB *Nature* 388: 548–554.
53. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, et al. 1997. IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated IκB kinases essential for NF-κB activation. *Science* 278: 860–866.
54. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. 1997. Identification and characterization of an IκB kinase. *Cell* 90: 373–383
55. O'Dea E, Hoffmann A (2010) The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000216.
56. Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Feng Z, et al. (2001) NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 276: 48921-48929.
57. Bian X, Pipari AW, Jr., Ratanaproeaksa AB, Boitano AE, Lucas PC, et al. (2002) Constitutively active NFκappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma. *J Biol Chem* 277: 42144-42150.
58. Sabatino MA, Marabese M, Ganzinelli M, Caiola E, Geroni C, et al. (2010) Down-regulation of the nucleotide excision repair gene XPG as a new mechanism of drug resistance in human and murine cancer cells. *Mol Cancer* 9: 259.
59. Park YY, Jung SY, Jennings N, Rodriguez-Aguayo C, Peng G, et al. (2012) FOXM1 mediates Dox resistance in breast cancer by enhancing DNA repair. *Carcinogenesis*.
60. Carey JP, Asirvatham AJ, Galm O, Ghogomu TA, Chaudhary J (2009) Inhibitor of differentiation 4 (Id4) is a potential tumor suppressor in prostate cancer. *BMC Cancer* 9: 173.
61. Ananthi J, Asirvatham J P W, Carey, Jaideep C (2007) ID-, ID2-, and ID3-Regulated Gene Expression in E2A Positive or Negative Prostate Cancer Cells. *The prostate* 67:1411-1420.
62. Sobrado VR, Moreno-Bueno G, Cubillo E, Holt LJ, Nieto MA, et al. (2009) The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci* 122: 1014-1024.
63. Kurabayashi M, Jeyaseelan R, Kedes L (1994) Doxorubicin represses the function of the myogenic helix-loop-helix transcription factor MyoD. Involvement of Id gene induction. *J Biol Chem* 269: 6031-6039.
64. Ho WC, Dickson KM, Barker PA (2005) Nuclear factor-kappaB induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells. *Cancer Res* 65: 4273-4281.

65. Bentires-Alj M, Barbu V, Fillet M, Chariot A, Relic B, et al. (2003) NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22: 90-97.

Referencias electrónicas

- 1* Instituto Nacional del Cancer, <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>. 2011
- 2* Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática(INEGI). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales 2007. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/>
- 3* The Leukemia & Lymphoma Society. <http://www.lls.org/> 2011
- 4* Protein data bank <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1UBD>