



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES  
FÁRMACOS (MDR1) EN CELULAS EPITELIALES DE COLON: ESTUDIO IN VITRO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

**MARCO ANTONIO VILLEDA RAMÍREZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JESÚS KAZUO YAMOTO FURUSHO  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DR. AARÓN DOMÍNGUEZ LÓPEZ  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
UNIDAD DE BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. ENERO DE 2013



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de octubre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (Biología Experimental) del alumno VILLEDA RAMÍREZ MARCO ANTONIO con número de cuenta 510007953, con la tesis titulada "REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS (MDR1) EN CÉLULAS EPITELIALES DE COLON: ESTUDIO *IN VITRO*" realizada bajo la dirección del DR. JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO:

Presidente: DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Secretario: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
Suplente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
Suplente: DR. AARÓN DOMÍNGUEZ LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de enero de 2013

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA

## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradecimientos al Postgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca para realizar mis estudios de Postgrado y al comité tutorial integrado por el Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho, como tutor principal, los doctores Aarón Domínguez López y Emilio Rojas del Castillo.







*Dedicada a:  
A mis padres y hermanos.  
A Carmelita.*

*Agradecimientos:*

*Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la dirección del Jefe de la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho.*

*Al personal del departamento de Gastroenterología del INCMNSZ por su amabilidad, disposición, apoyo y confianza durante los 6 años que me han permitido trabajar con ustedes.*

*A los Doctores Aarón Domínguez López y Emilio Rojas del Castillo por sus sabias observaciones y comentarios que me contribuyeron a la realización de este proyecto.*

*Agradecimiento en especial al Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho quien desde hace 6 años deposito su confianza en mí, a quien admiro, estimo y respeto. Gracias por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por ser una inspiración y ejemplo a seguir, fue un honor haber trabajado con usted. Gracias por enseñarme lo valioso y lo importante que es hacer la diferencia. Cada uno de sus consejos, enseñanzas y observaciones las tengo muy presentes porque me han ayudado a crecer como profesionista y como persona. Muchas gracias por todo.*

*Mientras el tímido reflexiona,  
El valiente va, triunfa y vuelve  
Proverbio griego.*

*Las grandes almas tienen voluntades;  
Las débiles tan solo deseos.  
Proverbio Chino.*

*Más confío en el trabajo  
Que en la suerte.  
Proverbio latino.*

## *ABREVIATURAS*

ABC	ATP Binding Cassette Family (Proteínas de unión a ATP).
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico de cadena complementario
AMPK	AMP-activated protein kinase.
AP-1	Activated protein 1 (Proteína activadora 1)
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero.
ATP	Adenosintrifosfato.
BCRP	Breast Cancer Resistance protein 1
bp	Pares de bases.
CDX2	Caudal-related homeobox transcription factor
CFTR	Cistic fibrosis receptor
CUCI	Colitis ulcerativa crónica idiopática
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
EMEM	Eagle's minimum essential medium
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$ (Interleucina 1 $\beta$ )
iNOS	inducible nitric oxide synthase (Oxido nítrico sintasa inducible)
Kb	Kilobases
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MDR1	Multidrug Resistant Gene 1 (Gen de resistencia a múltiples drogas 1).
MRP2	Multidrug Resistant Protein 2 (Proteína de resistencia a fármacos 2).
NBD	Nucleotide binding domain (Dominio de unión a nucleótidos).
NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B (Factor nuclear $\kappa$ B)
NK	Natural Killer.
PCR	Polimerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
Pgp	Glycoprotein P (Glucoproteína P).
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
PXR	Pregnane X receptor
RPLR0	Ribosomal protein large 0

TCF/LEF	T-cell factor 4/lymphoid enhancer factor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$ (Factor nuclear $\alpha$ )
UV	Ultravioleta.
UTR	Untranslated Region

## *ÍNDICE*

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
1.1	ABSTRACT	2
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>5</b>
<b>V.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
5.1	Proteínas de unión a ATP (ABC)	6
5.2	Gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1)	7
5.3	La Glucoproteína-P	9
5.4	Expresión de la Pgp en diferentes tejidos	12
5.5	Regulación de la expresión de MDR1 y la Pg	13
5.5.1	Regulación de la expresión por factores de transcripción	13
5.5.2	Regulación de la expresión por mecanismos epigenéticos	15
5.5.3	Regulación de la expresión por factores ambientales	17
5.5.4.	Regulación post-transcripcional de MDR1	19
5.5.5.	Regulación a través de vías de señalización y citocinas	20
5.6	Importancia clínica de la expresión de MDR1 y la Pgp	22
<b>VI.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
7.1	Expresión del ARNm de MDR1 en células CACO2	28
7.2	Expresión del ARNm de la iNOS en células CACO2	29
7.3	Expresión del ARNm de la IL6 en células CACO2	30
7.4	Expresión del ARNm de MDR1 en células HT29	31
<b>VII.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>32</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>40</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>50</b>



## *ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS*

### ***FIGURAS***

Figura 1	Elementos del promotor y factores de unión a ADN involucrados en la regulación de la transcripción de MDR1	9
Figura 2	Estructura de la Pgp	10
Figura 3	Regulación de la expresión de MDR1 en células de riñón de rata	22
Figura 4	Diseño metodológico	24
Figura 5	Expresión del ARNm de MDR1 en células CACO2	28
Figura 6	Expresión del ARNm de la iNOS en células CACO2	29
Figura 7	Expresión del ARNm de la IL6 en células CACO2	30
Figura 8	Expresión del ARNm de MDR1 en células HT29	31
Figura 9	Vías de regulación MDR1/Pgp	38

### ***TABLAS***

Tabla 1	Estructura de los transportadores ABC	7
Tabla 2	Principales sustratos de la Glucoproteína P	11
Tabla 3	Características de las líneas celulares	25
Tabla 4	Mezcla de reactivos para RT-PCR	51
Tabla 5	Ciclos del protocolo de la RT-PCR	51
Tabla 6	Mezcla de reactivos de la PCR tiempo real	52
Tabla 7	Ciclos del protocolo de la PCR tiempo real	52
Tabla 8	Secuencia del gen MDR1	53
Tabla 9	Secuencia del gen de la IL6	55
Tabla 10	Secuencia del gen de la iNOS	56
Tabla 11	Secuencia del gen RLOP0	57

## ***I.- RESUMEN***

El gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1) también conocido como ABCB1, pertenece a la familia de proteínas ABC (ATP Binding Cassette Family). Codifica para la Glucoproteína-P (Pgp), una proteína transmembranal que funcionan como bomba de expulsión de diversas sustancias fuera de las células. La sobreexpresión de la Pgp se asocia con resistencia a fármacos en cáncer y en Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), la baja expresión se asocia con un curso clínico más grave y falla de respuesta al tratamiento médico. El objetivo de esta investigación fue determinar los cambios en la expresión del gen MDR1/Pgp generados por el proceso inflamatorio en células epiteliales de colon. Se indujo inflamación en células epiteliales de carcinoma de colon CACO2 y HT29 con proteínas recombinantes de  $TNF\alpha$  e  $IL\beta$  y LPS de *Salmonella Tiphy* (10 ng/ml y 10  $\mu$ g/ml respectivamente) 1, 6, 12 y 24 horas. Como marcadores de inflamación se determinó la expresión de la IL6 y la iNOS. A partir de las líneas celulares se realizó la extracción de ARNm total y posteriormente se realizó la síntesis del ADNc mediante transcripción reversa (RT-PCR). El análisis de expresión del gen ARN mensajero (ARNm) del gen MDR1, iNOS e IL-6 se realizó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tiempo. El análisis de resultados se realizó por pruebas de U de Mann-Whitney, tomando como valor significativo un valor de  $p < 0.05$ . En células CACO2 incrementó la expresión de MDR1 a 1 y 6 horas, la iNOS tuvo incrementaron a las 6 y 12 horas y la IL6 desde 1 hasta las 24 horas para el estímulo con  $IL1\beta$ . Al incubar con  $TNF\alpha$  la expresión de MDR1 y la iNOS incremento desde las 6 horas y la IL6 sólo a las 6 y 12 horas. La disminución de la expresión de MDR1 se determinó a partir de las 6 horas al estimular con LPS, la IL6 solo incrementó a 1 hora y no se observó cambio significativo en la expresión de la iNOS. En células HT29 el gen MDR1 solo incrementó a las 24 horas de estímulo con  $TNF\alpha$ .

**Palabras clave:** Gen MDR1, Proteína Pgp, iNOS, IL6,  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ , LPS.

## ***1.1. - ABSTRACT***

The Multidrug Resistant 1 (MDR1) gene also known as ABCB1, belongs to the ABC transporters family (ATP Binding Cassette Family), MDR1 gene encodes for P-glycoprotein (Pgp) a transmembrane protein that efflux a wide range of substances out of the cell. In cancer the over expression of Pgp is associated with multidrug resistance. In Inflammatory Bowel Disease (IBD) the low expression of MDR1 is associated with a failed medical treatment response and continues activity. The aim of this work was to determine the expression changes of MDR1/Pgp generated under inflammatory conditions in epithelial colon cells. Inflammation was induced in CACO2 and HT29 epithelial colon cells by human recombinant TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and *Salmonella Tiphya* lipopolischarides (10 ng/dl and 10  $\mu$ l/dl respectively) during 1, 6, 12 and 24 hours of incubation. The Nitric oxide sintasa (iNOS) and Interleukin 6 (IL6) expression levels was used as a inflammatory markers. Cells were lysed for total mRNA extraction; then cDNA synthesis was performed by Reverse-Transcription (RT-PCR). The mRNA expression analysis of MDR1, iNOS and IL6 gene was evaluated by Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR). The results were analyzed by U Mann-Whitney test, a  $p < 0.05$  value was consider as significant. Increase of level expression of MDR1 gene in CACO2 cell lines was reported from 1-6 hours, the iNOS expression increased at 6 and 12 hours and the IL6 at 1- 24 hours for IL1 $\beta$  stimuli. In TNF $\alpha$  incubation MDR1 and iNOS showed an increased in 6-24 hours and the IL6 only increase at 6 and 12 hours. A decreased expression of MDR1 was observed in LPS stimuli incubation at 6-24 hours, the IL6 only increased in 1 hour and no significant changes were observed in iNOS levels. In HT29 cell line increase the MDR1 expression at 24 hours of TNF $\alpha$  incubation.

**Key words:** MDR1 gene, Pgp protein, iNOS, IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , LPS.

## ***II.- INTRODUCCIÓN***

El gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1) también conocido como ABCB1, pertenece a la familia de proteínas ABC (ATP Binding Cassette Family), codifica para la Glucoproteína-P (Pgp), una proteína transmembranal que funcionan como bomba de expulsión de diversas sustancias fuera de las células. La sobreexpresión de la Pgp se asocia con resistencia a fármacos en cáncer y en Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) la baja expresión se asocia con un curso clínico más grave y falla de respuesta al tratamiento médico. Son múltiples los factores que modifican la expresión de MDR1/Pgp, En el cáncer las citocinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  están involucradas en el inicio, progresión y metástasis de tumores; en la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (CUCI) los niveles de expresión de IL1 $\beta$  y TNF se encuentran elevados, mientras que los niveles de expresión de MDR1/Pgp se encuentran disminuidos. Además, se ha reportado a las citocinas proinflamatorias como reguladores de la expresión de MDR1/Pgp. Para determinar cómo el gen MDR1 y su producto la Pgp son regulados durante la inflamación, analizamos el efecto de la IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y LPS en células epiteliales de colon CACO2 una línea de cáncer de colon que expresa altos niveles de MDR1 y células HT29 como control ya que sus niveles de expresión son considerablemente bajos.

### ***III.- OBJETIVOS***

- **Objetivo general:**

Determinar si los niveles de expresión del gen MDR1 y de su producto Pgp dependen del proceso inflamatorio.

- **Objetivos Específicos:**

- Determinar los niveles de expresión del ARN m del gen MDR1 en líneas celulares de carcinoma de colon CACO2 y HT29 estimuladas con  $TNF\alpha$ , e  $IL1\beta$  recombinantes y con lipopolisacáridos de *Salmonella typhi*.
- Determinar los niveles de expresión del ARN m del gen iNOS e IL6 como marcadores de inflamación en líneas celulares CACO2 y HT29 estimuladas con  $TNF\alpha$ , e  $IL1\beta$  recombinantes de y con lipopolisacáridos de *Salmonella typhi*.

#### ***IV. HIPÓTESIS***

En la CUCI los niveles de expresión de IL1 $\beta$  y TNF y los niveles de expresión de MDR1/Pgp se encuentran disminuidos. Además, se ha reportado a las citocinas proinflamatorias participan en la regulación de la expresión de MDR1/Pgp. De tal manera que se sugiere que el proceso inflamatorio contribuye a la disminución de los niveles de expresión del gen MDR1/Pgp.



## ***V.- ANTECEDENTES***

### **5.1 Proteínas de unión a ATP (ABC)**

Las proteínas de unión a ATP (ABC por sus siglas en inglés ATP Binding Cassette) forman un total de 48 proteínas que funcionan como bombas de expulsión de diversas sustancias fuera de las células mediante un proceso dependiente de ATP y particularmente se localizan en tejidos permeables (Tabla 1) (Lescheziner G. y cols. 2006. Leslie EM. y cols. 2005). La mayoría de los miembros de las proteínas ABC transportan una gran variedad de compuestos a través de las membranas como: fosfolípidos, iones, péptidos, esteroides, polisacáridos, aminoácidos, aniones orgánicos, ácidos biliares, fármacos y otros xenobióticos (Leslie EM. y cols. 2005).

Las proteínas ABC se agrupan en clases estructurales o subfamilias, con base en la secuencia de sus aminoácidos y en la organización de los dominios (Sheps JA. y cols. 2004). Las proteínas ABC están integradas por 2 conjuntos de dominios transmembranales y 2 dominios de unión a ATP los cuales están integrados por 2 dominios conservados: dominios Walker A, B y un motivo denominado C, que es específico para las proteínas ABC y que las distingue de otras proteínas transportadoras dándoles la característica de transportadores completos (Mercado-Lubo R. y McCormick BA. 2010). El residuo de lisina del dominio A es el responsable de la interacción con el  $\beta$  fosfato del ATP, mientras que el residuo aspártico del dominio B interactúa con el magnesio (Leslie EM. y cols. 2005). Se consideran como transportadores intermedios a las que poseen alguno de los dominios y que se encuentran como homodímeros y heterodímeros para crear una proteína funcional. Los dominios de unión a ATP se encuentran localizados en el citoplasma y son los responsables de la especificidad de sustratos (Dean M. y cols. 2001).

Se ha caracterizado el papel de algunas proteínas ABC en múltiples procesos celulares. Proteínas de la familia de ABCA, ABCC y ABCG están involucradas en la homeostasis de la glucosa, colesterol y los lípidos en diferentes tipos celulares (Matsuo M., 2010. Evidencias recientes sugieren un papel directo de transportadores ABC como la Pgp, MRP2 y CFTR en el reconocimiento de bacterias patógenas

(Mercado-Lubo R y McCormick BA. 2010). Transportadores como MDR1, MRP1-5 o ABCB1-5 son responsables de la resistencia a múltiples fármacos y el transporte de aniones orgánicos. Dado que las proteínas ABC transportan una gran variedad de compuestos su distribución y localización es diferentes tejidos juega un papel muy importante en diversos procesos celulares y patológicos (Leslie EM. y cols. 2005).

Tabla 1: Organización de los transportadores ABC.

<b>Subfamilia</b>	<b>Miembros</b>
ABCA	ABCA1-ABCA10, ABCB12,ABCA13.
ABCB	ABCB1-ABCB11
ABCC	ABCC1-ABCC12
ABCD	ABCD1-ABCD4
ABCE	ABCE1
ABCF	ABCF1-ABCF3
ABCG	ABCG1,ABCG2.ABCG4,ABCG5,ABCG8

Fuente: Dean M. y cols. 2001.

## 5.2 Gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1).

El gen de Resistencia a Múltiples drogas (MDR1), también conocido como ABCB1, fue el primer miembro de la familia de transportadores ligados a ATP (ABC) en ser identificado en las membranas caniculares de los hepatocitos. Fue el primero en ser aislado de un ovario de hámster y reconocido por conferir resistencia a múltiples fármacos (Annese V. y cols. 2006).

Keld Dano descubrió en 1973 a las proteínas causantes de conferir resistencia a múltiples drogas. En 1976 Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína tras observar reportes, en los cuales, células de cáncer de mama presentaban resistencia a fármacos (Chowbay B. y cols. 2002). Sin embargo, fue hasta que Victor Ling y otros investigadores en 1983 dieron a conocer que el aumento en la expresión de la glucoproteína estaba implicado en la resistencia a fármacos (Paredes y col., 2006).

La familia del gen MDR1 en el humano consta de 4 transportadores completos y 7 transportadores intermedios: ABCB4 y ABCB11 se expresan en el hígado y están

involucrados en la secreción de ácidos biliares, ABCB2 y ABCB3 forman un heterodímero y transportan péptidos al retículo endoplasmático de la células, ABCB9 ha sido localizado en los lisosomas, mientras que ABCB6, ABCB7, ABCB8 y ABCB10 se expresan en la mitocondria (Dean M. y cols. 2001).

El gen MDR1 está localizado en el brazo largo del cromosoma número 7 en la región 21 en humanos, mientras que en ratones y ratas se han caracterizado 2 genes homólogos (Abcb1a y Abcb1b), localizados en el cromosoma número 5 y 4 respectivamente con un porcentaje de identidad de aminácidos del 85% entre cada uno de ellos y un 80% en comparación al gen MDR1 del humano (Ishikawa T. y cols. 2004. Leslie EM. y cols. 2005).

El tamaño total del gen ha variado conforme se ha estudiado; el último reporte establece una longitud de 209 kilobases (kb) y está compuesto por 29 exones. El ARNm consiste de 4872 pares de bases (bp) (Bodor M. y cols. 2005). En líneas celulares de colon (SW260, HT29 y HT29/M6) el ARNm producido es 285 bp más corto que el producido en células MCF-7/Adr y K562/Adr. La diferencia en el número de bp sugiere el uso de promotores alternativos (Gómez-Martínez A. y cols. 2007).

Yagüe E. y sus colaboradores determinaron que la vida media del mensajero de MDR1 es de 1 hora en células k562 (línea de celular de leucemia), dato que contrasta con otros estudios que reportan una vida media larga de 8 horas en células HepG2 (línea celular de hepatocarcinoma). Sin embargo, observaron que la vida media incrementó entre 12 y 16h en líneas celulares de resistencia a fármacos y hasta 10h tras ser expuestas a fármacos (Yagüe E. y cols. 2003).

El gen MDR1 pertenece a un grupo de genes que carecen de la caja TATA dentro de la región proximal del promotor. Por lo que la transcripción inicia en una secuencia Inr (secuencia iniciadora). Al igual que otros genes carentes de caja TATA, el promotor también está compuesto por una secuencia CCAAT (-82 a -73) y una

región rica en GC (-56 a -43) que interactúan con los factores transcripcionales de la familia Sp (Figura 1)(Scotto KW. y Johnson RA. 2001).

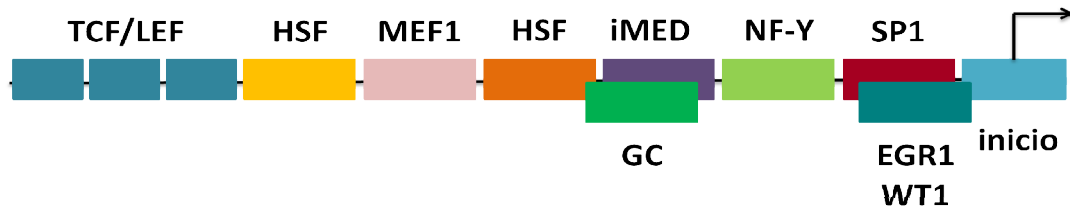


Figura1: Elementos del promotor y factores de unión a ADN involucrados en la regulación de la transcripción de MDR1. SP1 y NF-Y representan los principales factores de transcripción que regulan la expresión de MDR1. iMED, MEF1, HSF, TCF/LEF y EGR1 son responsable de la activación mientras que WT1 suprime su expresión.

### 5.3 La Glucoproteína-P

El gen MDR1 codifica a la glucoproteína- P (P-gp) perteneciente a la familia de las ABC, una familia de proteínas transmembranales que sirve como una barrera de protección para las células al transportar sustancias y toxinas fuera de las células, mediante un proceso dependiente de ATP (Loo TW. y cols. 2006).

La P-gp está constituida por 1280 residuos de aminoácidos, tiene un peso molecular de 170 kDa, está conformada por 2 cadenas homólogas y simétricas que constan de 6 dominios transmembranales, con una cadena N-terminal hidrofílica y una N-terminal hidrofóbica, seguidos de 2 dominios de unión a ATP (Ishikawa T. y cols. 2004). Los dominios de unión a ATP (NBD 1 y 2), son importantes para su función dado que pueden hidrolizar el ATP y la inhibición de estos sitios conlleva a la inhibición de la proteína. La unidad mínima funcional de la P-gp es como monómero (Loo TW y cols. 2006. Verhalen B. y Wilkens S. 2011).

Además, la P-gp presenta una cadena de carbohidratos, situada sobre la cadena exterior de aminoácidos que une los dos primeros segmentos transmembranales, cerca del extremo N-terminal de la proteína, que al menos 20 kDa de los 170 kDa de la proteína son debidos a esta cadena de carbohidratos. Evidencias aseguran que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte de drogas o

reconocimiento (Ruiz GM. y cols. 2002). La vida media promedio de la glucoproteína P es relativamente larga y oscila entre 14 a 16 horas (Wu H. y cols. 2003).

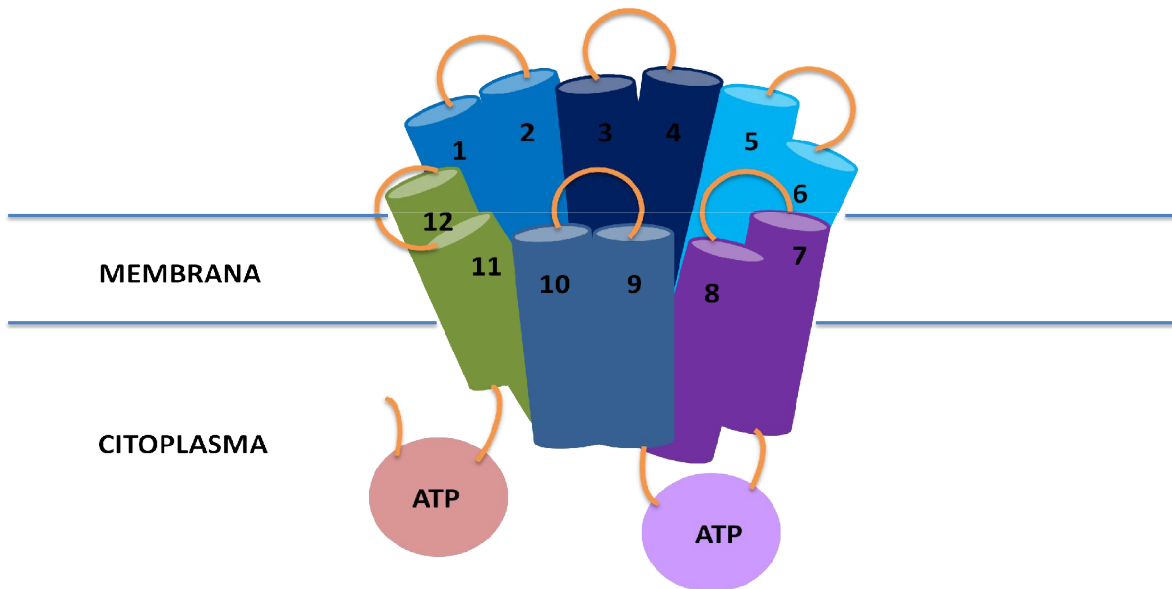


Figura 2: Estructura de la Pgp. La Pgp está constituida por 2 cadenas homologadas agrupadas en 6 dominios transmembranales, presenta 2 dominios de unión a ATP indispensables para el transporte de sustratos. Tiene un peso molecular de 170 kDa.

El primer paso del transporte de fármacos y toxinas de la Pgp es el reconocimiento de la sustancia, posteriormente el ATP es hidrolizado. La alta afinidad de los sustratos reside en una cavidad anfipática formada por los 2 NBDs dicha cavidad esta estructurada por los dominios 6, 12, 1, 4, 10, 11, donde se forma tanto el sitio de unión como el de especificidad del sustrato (Verhalen B. y Wilkens S. 2011). La energía liberada durante el proceso es utilizada para liberar al fármaco o sustancia fuera de la célula mediante el poro central. Dos moléculas de ATP son necesarias para realizar el proceso: la primera en la expulsión del fármaco que implica un cambio conformacional de la proteína y la segunda en el llevar a la proteína a su conformación inicial. Algunos fármacos estimulan la actividad de ATPasa a bajas concentraciones generando inhibición cuando se encuentran a altas concentraciones. También se ha descrito un segundo grupo de compuestos que potencian la actividad dependiente de la dosis, otros compuestos generan inhibición o estímulo de la hidrólisis de ATP al incrementar o disminuir la distancia entre el

dominio Walker A y B (Bansal y cols. 2009. Amdudkar SW. y cols. 2003. Zuben ES. y cols. 2007).

La Pgp tiene múltiples sitios de unión indispensables durante el proceso de expulsión de los diferentes sustratos. Becker y col. identificaron una región de residuos aromáticos en el sitio de unión (NBD) que posiblemente contribuye en la transmisión de señales (Becker y cols. 2009). Por otra parte estos múltiples sitios de unión en los dominios transmembranales en la Pgp también juegan un papel importante en el reconocimiento de la amplia variedad de sustratos los cuales probablemente comparten entre sí estos sitios de reconocimiento (Ambudkar SV y cols., 2006).

La variación en la expresión de la P-gp en el intestino juega un papel importante en la farmacocinética de una amplia variedad de sustratos (Annese V. y cols. 2006). Diversas clases de fármacos son transportados por la Pgp los cuales incluyen: anti arrítmicos, antihipertensivos, antibióticos, inmunosopresores, antineoplásicos, glucocorticoides (Tabla2) (Ambudkar SV. y cols. 2006). Dentro de los principales compuestos químicos hidrofóbicos destacan la colchicina, vinca alcaloides, antibióticos, antraciclinas, glucósido cardiaco, cationes orgánicos y pesticidas (Silva R. y cols. 2010).

Tabla 2: Principales sustratos de la glucoproteína P.

<b>Fármacos</b>	<b>Tipos</b>
Antineoplásicos	Actinomicina D, daunorubicina, mitocina C, mitoxantrona, vinblastina, vincristina.
Antihipertensivos	Diltiazem y losartan
Antiarrítmicos	Digoxina, quinidina, verapamil
Corticoesteroides	Aldosterona, cortisol, dexametasona, metilprednisona
Inmunosupresores	Ciclosporina, tacrolimus, metotrexato
Antibióticos	Eritromicina, levofloxacin, tetraciclina, rifampicina

Fuente: Adaptado de Annese V. y cols. 2006



La expresión de la Pgp resulta de gran interés ya que la sobreexpresión resulta en la resistencia a fármacos mientras que la baja expresión se asocia como un factor de riesgo para el desarrollo de Enfermedad inflamatoria intestinal. Recientemente estudios realizados en modelos animales han sugerido que la Pgp también participa en la homeostasis del colesterol. En células de páncreas de rata se ha observado que participa en la regulación de la secreción de la insulina en particular en la segunda fase. Sin embargo, se requiere de mayor investigación que sugieran esta misma función en células de humano (Le Goff W. y cols 2006. Tang Y. y cols. 2009)

#### **5.4 Expresión de la Pgp en diferentes tejidos.**

La glucoproteína-P se encuentra como componente de diversos tejidos y órganos con características de permeabilidad como la barrera hematoencefálica y placentaria. Se expresa normalmente en el colon, el intestino delgado y de forma variable a lo largo del tracto gastrointestinal, las suprarrenales, el riñón, ovario y testículos, en células especializadas como hepatocitos y enterocito, células hematopoyéticas, linfocitos T y células NK (por sus siglas en inglés natural killer), (Annese V. y cols. 2006. Basal y cols. 2009). Los niveles de expresión de la Pgp en diferentes tejidos son variables, esto obedece a la diferenciación, funciones tejido-específico y varían en respuesta a cambios ambientales (Gómez-Martínez A. y cols. 2007).

En el tracto gastrointestinal los niveles de expresión de la Pgp incrementan longitudinalmente, con bajos niveles en el estómago y altos niveles en el colon. En este último, la Pgp se localiza en la membrana apical de la células epiteliales (Bertilsson PM. y cols. 2000), en intestino delgado se ha determinado en todos sus segmentos con baja expresión en duodeno y altos niveles en el íleon terminal (Bruyère A. y cols. 2010). El principal papel de la Pgp en el tracto gastrointestinal es el de detoxificación celular pero recientemente se ha asociado la expresión de la Pgp en un mecanismo de reconocimiento de bacterias patógenas evitando la invasión de las mismas (Mercado-Lubo R. y McCormick BA. 2010).

En el hígado se encuentra en superficie canicular de los hepatocitos, en el riñón en la superficie apical de las células epiteliales (Al-Bateineh MM. y cols. 2010). En barreras biológicas como la barrera hematoencefálica la Pgp se encuentra distribuída en la membrana apical del endotelio cerebral (Pan W. y cols. 2010).

### **5.5 Regulación de la expresión de MDR1 y la Pgp.**

La expresión de la Pgp está regulada por factores transcripcionales, postranscripcionales y por estímulos endógenos y ambientales. Factores como citocinas, radiación por rayos X y UV, pueden influir en los niveles de expresión de la Pgp en diversos sistemas (Scotto KW. y Jonson RA. 2001). Fármacos como dexametasona, rifampicina, doxurubicina, daunorubicina, vinblastina, inducen la expresión de la Pgp (Silva R y cols., 2010).

#### **5.5.1 Regulación de la expresión por factores de transcripción.**

La expresión del gen MDR1 puede ser influenciado por diversos factores. En estudios recientes demuestran que estos estímulos convergen en la región promotora de MDR1 que incluye sitios de unión para los factores transcripcionales NFY y Sp (Scotto KW. y Johnson RA. 2001. Gómez-Martínez A y cols. 2007). Johnson y col. en el 2005 demostraron que la familia de factores transcripcionales p53 reprimen la transcripción de la P-gp a través de la unión directa a una región específica del ADN, posteriormente demostraron que p63 y p73 pertenecientes a la familia de p53 pueden activar la transcripción de MDR1 a través de una región de unión independiente a la de p53.

En células de cáncer de diversos tejidos se observa una sobreexpresión del gen MDR1, así como de factores de transcripción como la proteína 1 de unión a la cadena terminal C (CtBP1) que se encuentra incrementada en líneas celulares de cáncer, lo que sugiere una función importante en la activación de la transcripción (Jin W. y cols.2007). El factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) es otro de los factores implicados en la expresión de MDR1. Se ha observado que la inhibición de

p-38-MAPK reduce la activación de AP-1 y en consecuencia la de MDR1 (Guo y cols. 2008).

En el intestino el factor de transcripción más implicado en la regulación de la expresión de MDR1 es PXR (por sus siglas en inglés pregnane X receptor), ya que se ha observado disminución de las concentraciones de los sustratos de la Pgp por la rifampicina, un inductor del PXR. Kota y colaboradores determinaron incremento de la Pgp dependiente de la dosis y del tiempo de exposición a la rifampicina en células de adenocarcinoma de colon LS174T. Dichos resultados fueron comprobados al observar decremento de la expresión de la Pgp tras ser estimuladas con ketoconazol un inhibidor del PXR (Kota BP. y cols. 2010). Sin embargo, Blokzijl y sus colaboradores evaluaron los niveles de expresión de MDR1 y de PXR en diferentes procesos inflamatorios del tracto gastrointestinal, compararon muestras de tejidos de pacientes con enfermedades inflamatorias con muestras de pacientes sin inflamación y determinaron que la regulación de MDR1 en inflamación es independiente de PXR (Blokzijl H. y cols. 2007).

Dentro del promotor del gen *Mdr1* en ratas se han caracterizado sitios de unión para factores de transcripción p53 y NF $\kappa$ B localizados a -38 bp río abajo del sitio de inicio de la transcripción (*Inr*). En células de carcinoma de la cavidad oral tratadas con una dosis clínica de radiación de 2 Gy en combinación con quimioterapia, se determinó incremento de la expresión de MDR1 secundaria a la inducción de NF $\kappa$ B y NF-Y, mientras que a bajas dosis fraccionadas de radiación (0.5 Gy) disminuyendo la expresión de NF $\kappa$ B, NF-Y y MDR1 e incrementando la efectividad de la quimioterapia (Shareef MM. y cols. 2008).

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR's) regulan una gran diversidad de procesos celulares y de acuerdo a diversos estudios también regulan el proceso de resistencia a múltiples fármacos. En ratones sometidos a dieta con agonistas de PPAR $\alpha$  se observó incremento de *Abcg2*, disminución de *Mrp1* y no se observaron cambios en los niveles de expresión de *Mdr1* pero en otro estudio

realizado en células HepG2 se observó incremento de PPAR $\alpha$  y de los niveles de citotoxicidad con disminución de MDR1 al incubar las células con TNF $\alpha$  (Konieczna A. y cols. 2009).

En células SGC7901/VCR Zhao Y. y sus colaboradores reportaron que la sobreexpresión de los factores de transcripción PEA3 y MyoD incrementa la expresión de MDR1. Además caracterizaron 4 sitios de unión para PEA3 y 3 sitios E-box que resultan blancos para la unión de MyoD, modificaciones en la secuencia de PEA3 y MyoD atenuó la expresión de MDR1 (Zhao Y. y cols. 2010).

El factor de transcripción CDX2 (caudal-related homeobox) involucrado en procesos como la diferenciación celular ha sido descrito como un factor regulador de la expresión de MDR1/Pgp a través de la unión directa a elementos en la región promotora. En células HT29 con bajos niveles de expresión de MDR1/Pgp se sobreexpresó CDX2 y se observó incremento de MDR1/Pgp (Takakura Y. y cols. 2010).

### **5.5.2 Regulación de la expresión por mecanismos epigenéticos.**

Uno de los principales mecanismos de la regulación de la expresión génica es la modificación de histonas. En la activación del gen MDR1 se ha determinado incremento de la metilación de la histona H3 (H3K4). La acetiltransferasa de histonas P/CAF se ha reportado como responsable de la acetilación de histonas del promotor de MDR1, mientras que la sobreexpresión de la MLL1, una metiltransferasa, incremento a nivel de proteína y ARN mensajero el gen MDR1 en células HeLa (Huo H. y cols. 2010). Jin W y sus colaboradores determinaron que el protooncogen UHRF1 con función de factor de transcripción, participa en el secuestro de la HDAC1 (Deacetilasa de histonas 1) formando un complejo que inhibe la transcripción a través de la unión directa al promotor de MDR1 en células NCI/ADR-RES (Jin W. y cols. 2009).

Para optimizar el tratamiento farmacológico en el cáncer diversos, agentes se han implementado encaminados a la modificación de histonas. Por ejemplo; en líneas celulares de cáncer de pulmón V. El-Khoury y colaboradores determinaron el efecto de un inhibidor de acetilación de histonas (TSA por sus siglas en inglés trichostatin A) observaron la TSA inducía un incremento de MDR1 en las células sensible y un decremento en células resistentes a fármacos (El-Khoury V. y cols. 2007 ), también se ha empleado en el tratamiento de cáncer de colon, renal y leucemia ya sea solo o en conjunto con el ácido retinoico que es un agente desmetilador de ADN (Hauswald S. y cols. 2009).

Tae-bum y colaboradores determinaron la expresión de MDR1 en distintas líneas celulares de cáncer gástrico y de cáncer de colon, observando una menor expresión de MDR1 en líneas celulares de cáncer gástrico comparado con líneas celulares de cáncer de colon. Proponen que esta variación en la expresión de MDR1 se debe en parte a mecanismos epigenéticos de regulación tales como la metilación del ADN, ya que en el 90% de las células gástricas y en el 30% de las de colon el ADN se encontraba metilado, lo cual podría explicar la variabilidad de respuesta farmacológica en los distintos tipos de cáncer (Tae-Bum L. y cols. 2008).

En mucosa de pacientes con CUCI los niveles de metilación de MDR1 fueron significativamente mayores en mucosa inflamada en comparación con mucosa no inflamada. Además se asoció una mayor metilación del promotor del gen con características clínicas como la presencia de pancolitis (inflamación total del colon) y con el curso clínico continuo. Dado que la metilación representa uno de los mecanismos de silenciamiento de genes más importantes, estos resultados apoyan el papel de la baja expresión de MDR1 en el desarrollo del proceso inflamatorio observado previamente en ratones Knock-out de MDR1 (Tahara T. y cols. 2009). El hábito de fumar se ha asociado con diferentes tipos de cáncer. Estudios de caso-control revelan una asociación positiva entre el hábito de fumar y el cáncer de próstata. Enokida H. y sus colaboradores determinaron mayor índice de metilación de MDR en pacientes con carcinoma de próstata en comparación con pacientes con

hiperplasia benigna prostática. Además el hábito la frecuencia y el tiempo de fumar se asoció con la progresión y pronóstico del carcinoma de próstata a través de la hipermetilación de las islas CpG de dichos genes (Enokida H. y cols. 2006).

Estudios previos demostraron que la sobreexpresión del gen WTH3 contribuía a la disminución de la expresión de MDR1 sugiriendo una correlación negativa entre MDR1 y WTH3. Recientemente se ha identificado un sitio de unión para p53 en el promotor de WTH3 localizado en una isla CpG, un blanco para la metilación del ADN, de tal manera que la metilación del ADN de WTH3 impide la unión de p53 a su promotor modificando la expresión de MDR1 (Taina K. y cols. 2008).

### **5.5.3 Regulación de la expresión por factores ambientales.**

Condiciones fisiológicas como la lactancia, el embarazo y el proceso inflamatorio también pueden modular la expresión de la Pgp (Al-Bataineh MM. y cols. 2010).

En muestras de intestino de ratas se determinó la expresión de MDR1 a diferentes intervalos de tiempo (Z0, Z6, Z12, Z18) tomando como Z0 las 7:00 am. Observaron incremento significativo a los tiempos Z6 y Z12 siendo este último el pico máximo de expresión, sin embargo, cuando las ratas eran sometidas a ayuno se invertían los niveles de expresión reportando disminución de la expresión a los tiempos Z6 y Z12 (Hayashi Y. y cols. 2010)

En células de adenocarcinoma de colon HT29 con bajos niveles de expresión y SW650 con altos niveles de expresión de MDR1 se determinó disminución de la expresión del gen hasta en un 50% al ser incubadas con retinol comparadas con un grupo control sin tratamiento a través de un mecanismo redox-dependiente. Sin embargo, el mecanismo molecular o las posibles vías de señalización involucradas en la regulación de MDR1 por el retinol requieren de mayor estudio (Klamt F. y cols. 2008).



En células HT29 se determinó incremento de MDR1 y la Pgp por la adrenalina dependiendo de la dosis. Este incremento se producía únicamente vía el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, esto se comprobó al emplear bloqueadores de los receptores de adrenalina:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ -adrenérgicos, observando sólo disminución de la expresión de MDR. Además se determinó que el incremento de MDR1 se producía a través de la activación de la vía de proteincinasas activadas por mitógenos (MAPK), asociada a la activación de genes e involucrada en la activación de MDR1 bajo condiciones de estrés (Yao H. y cols. 2009).

Algunos estudios han evaluado el efecto de algunos ingredientes de la dieta y nutrientes sobre la expresión de MDR1 y la Pgp. Estudios en intestino e hígado de ratas se determinó incremento significativo de la Pgp al ser tratadas con  $1\alpha$ -hidroxivitamina  $D_2$  y  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina  $D_3$  respectivamente, lo cual sugiere un efecto tejido específico en el incremento de la expresión de la Pgp. Dichos resultados son similares a los obtenidos en células CACO2 donde se observó incremento significativo del ARNm y la Pgp al ser estimuladas con  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina  $D_3$  (Chow EC. y cols. 2001). En células HepG2 Marguerite V. y colaboradores reportaron disminución de la expresión de MDR1 /Pgp así como de su función, ya que se determinó incremento de la retención de la rodamina 123, tras la incubación con cobalamina (Vitamina V12) (Marguerite V. y cols. 2007). Se ha asociado interacción entre el jugo de toronja y la Pgp ya que se ha determinado disminución de la absorción de fármacos como la digoxina secundaria al consumo de jugo de toronja, sin embargo, el mecanismo exacto de interacción resulta desconocido (Owira PM. y cols. 2010). Algunos alimentos o ingredientes de la dieta: isoflavonoides como la purarina de la *pueraria lobata* y algunos lactobacilos regulan la expresión del gen MDR1/Pgp a través de diferentes vías de señalización (Hien TT. y cols. 2007. Saksena S. y cols. 2011).

#### **5.5.4. Regulación post-transcripcional de MDR1.**

La Pgp se expresa en tejidos normales como consecuencia de la diferenciación celular y en respuesta a cambios ambientales los cuales pueden regular su expresión a diferentes niveles. Diversos elementos contribuyen a la estabilidad del ARNm como la CAP en la región 5´ y la poli A en la región 3´ (Eberding A. y cols. 2004).

En células HT29 el grupo de Gómez-Martínez A y colaboradores determinaron una vida media del ARNm más corta que en células HCT-15. Además asociaron que la vida media es regulada por la longitud de las regiones 5´UTR, sugieren que 5´UTR más largas confieren e incrementan la eficiencia de la traducción. (Gómez-Martínez A y cols. 2007). Wang D. y Sadee determinaron que el polimorfismo de un solo nucleótido C3435T localizado en el exón 26 del gen MDR1 modifica la estructura, disminuye la vida media y estabilidad del ARNm repercutiendo en la estructura de la Pgp y especificidad de sustratos (Wang D. y Sadee. 2006. Kimchi Sarafy C. y cols. 2007). Lee CH. y colaboradores observaron que en células de cáncer de hígado la vida media del ARNm de MDR1 es mayor (+12 horas) en comparación con hepatocitos normales (- 12 horas), lo cual representa una posible explicación del fenómeno de resistencia a fármacos en células de cáncer (Lee CH. y cols. 2005).

La cantidad de RNAm es determinado por los porcentajes de degradación y síntesis, los cuales pueden ser determinados por estímulos ambientales y fisiológicos. (Eberding A. y cols. 2004). La estabilidad del ARNm es una determinante importante en la cantidad de ARNm, en células HepG2 tratadas con atorvastatina, un inhibidor de la Pgp se determinó disminución de la estabilidad del ARNm y expresión de MDR1 y la Pgp lo que sugiere un posible mecanismo de inhibición por fármacos (Rodrigues AC. y cols 2009). En otro estudio realizado en diferentes líneas celulares de cáncer se determinó que algunos fármacos sustratos de la Pgp contribuyen a la estabilidad del ARNm, sin embargo, no observaron la misma proporción en los niveles de la Pgp (Yagüe E. y cols. 2003).

### **5.5.5. Regulación a través de vías de señalización y citocinas.**

Como se ha descrito, son múltiples los factores que pueden modular la expresión de MDR1/Pgp. En condiciones patológicas como las infecciones o la inflamación se presenta una marcada liberación de citocinas, las cuales han mostrado diferentes resultados sobre la expresión de MDR1/Pgp de acuerdo al tipo celular en el cual se han investigado, así como: las concentraciones, tiempos de exposición y tipo de citocina. Esto sugiere que factores de transcripción y receptores están implicados en la regulación de la expresión (Fernández C. y cols. 2004)

Previamente se menciona que son múltiples los factores que participan en la regulación de la expresión de MDR1 y la Pgp. Durante el proceso inflamatorio donde se observa un marcado incremento de citocinas proinflamatorias y que se producen cambios en la función de barrera en los distintos tipos celulares, el efecto de estas citocinas en la regulación de la expresión de genes parece ser a diferentes niveles de: transcripción, traducción y postraducción (Al-Bataineh MM. y cols 2010).

Diversas vías de señalización han descrito y caracterizado, la vía de las cinasas activadas por mitógenos MAPK (por sus siglas en inglés MAPK: mitogen activated protein kinase) que responde a una gran variedad de estímulos es una de ellas. Ding S. y colaboradores determinaron que el incremento de MDR1/Pgp en células de cáncer de ovario se debía al incremento de la actividad de la vía MAPK ya que al inhibir esta vía disminuía la expresión de MDR1/Pgp (Ding S. y cols. 2001). En células CACO2 recientemente se determinó incremento de la expresión del ARN mensajero, de la Pgp y de su función después de ser incubadas con 2 diferentes lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus* y *L. rhamnosus*) durante 24 horas. Además se determinó que este incremento se debía a la activación de las vías fosfatidilinositol 3-cinasa y la vía ERK1/2 MAPK. Posteriormente en un modelo animal de inflamación inducida con dextrán sulfato de sodio en el cual la expresión de MDR1 es baja se observó incremento de la expresión del gen con la administración de los lactobacilos (Saksena S., y cols. 2011). En células de cáncer de colon HT29 cuyos niveles de expresión de MDR1 son bajos se determinó incremento de la expresión de MDR1 al

ser estimuladas con adrenalina a través del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico que a su vez se asocia con la activación de la vía MAPK (Herui Y. y cols. 2009).

Liu Y. y colaboradores recientemente caracterizaron la vía de regulación de MDR1 por la glucosilceramida sintasa (GCS). Se sabe que ambas proteínas se encuentran sobreexpresadas en células de cáncer en diferentes tejidos. En células de cáncer de ovario OVCAR-8 al realizar la transfección de la GCS se determinó sobreexpresión de MDR1/Pgp, además de la activación de cSrc cinasa con la disminución de la fosforilación de la  $\beta$ -catenina e incremento nuclear de  $\beta$ -catenina. El promotor de MDR1 contiene múltiples TCF/LEF (por sus siglas en inglés: T-cell factor 4/lymphoid enhancer factor) que representan blancos directos para  $\beta$ -catenina. Para demostrar la regulación de la GCS sobre MDR1 vía  $\beta$ -catenina, se emplearon bloqueadores de la cSrc y  $\beta$ -catenina/TCF observando disminución de la expresión de MDR1/Pgp (Lui YY. y cols., 2010).

En hígado y células de colon de rata se ha observado incremento de la actividad del promotor de Mdr1 al ser estimulados con  $\text{TNF}\alpha$  (Yu C y col., 2008). En células epiteliales inmortalizadas de riñón de rata se han propuesto 2 vías de regulación de la Pgp dependientes de mediadores inflamatorios inducidas por  $\text{TNF}\alpha$  y LPS, como se ilustra en la figura 3. Hien TT. y colaboradores en células de cáncer de mama determinaron incremento significativo de MDR1 al incubar las células con  $\text{TNF}\alpha$ , al realizar un estímulo combinado de  $\text{TNF}\alpha$  más puerarina (isoflavona de *puerarian lobata*) determinaron disminución de la expresión de MDR1 a través de la inhibición de  $\text{I}\kappa\text{B}$  y  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . El factor de transcripción  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y las diferentes vías que promueven su expresión, representan uno de los principales factores involucrados en la regulación de la expresión de MDR1/Pgp en diferentes tipos celulares de cáncer así como en células que constituyen tejidos de condiciones normales (Hein TT. y cols. 2010).

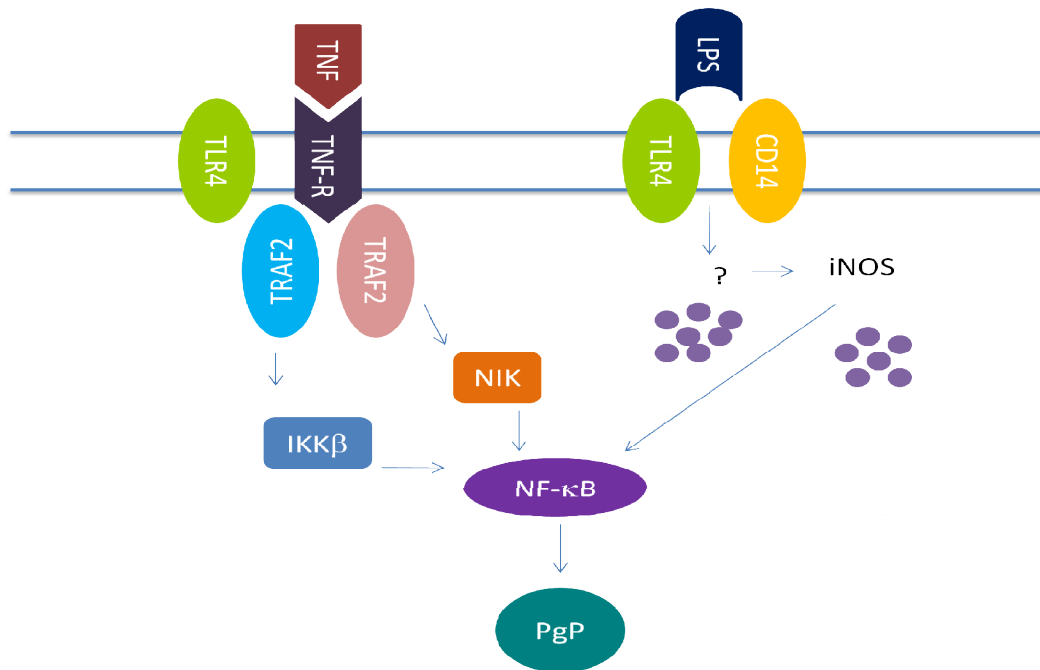


Figura 3: Regulación de la expresión de MDR1 en células de riñón de rata. La unión del TNF $\alpha$  y LPS a sus receptores en la membrana celular produce la activación de NF $\kappa$ B vía IKK $\beta$  y NIK, así como el incremento de iNOS, promoviendo la unión de NF $\kappa$ B al promotor de MDR1 estimulando el incremento de su expresión.

### 5.6 Importancia clínica de la expresión de MDR1 y la Pgp.

En muestras de tejido de cáncer de riñón con características de resistencia a fármacos empleados en la quimioterapia, al igual que otros modelos y tejidos tumorales, se identificó una sobreexpresión de MDR1 (Walsh y cols. 2009). Los mecanismos de resistencia a corticoesteroides han sido ya estudiados en condiciones de inflamación, particularmente en asma y artritis reumatoide aunque en enfermedad inflamatoria intestinal (EII) el mecanismo aún no está bien establecido. Una de las principales explicaciones es disminución de las concentraciones citoplasmáticas de corticoesteroides secundario a la sobreexpresión de la P-gp (Farell RJ. y Kelleher D. 2003).

La mayoría de los tumores presentan resistencia a múltiples fármacos empleados en el tratamiento del cáncer secundarios a una sobreexpresión de la Pgp (Paredes LA. y cols. 2006). En modelos celulares tumorales utilizados en el estudio del fenómeno

de resistencia a múltiples drogas se ha observado que aquellos que muestran resistencia a un fármaco anti-tumoral utilizados en un tratamiento también presentan resistencia a otros fármacos antitumorales (Zhai BJ. y cols. 2006).

La disminución de la expresión de MDR1/Pgp se ha asociado con el desarrollo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) específicamente con el desarrollo de colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI). Este hecho derivaba de lo observado en desarrolló colitis espontáneamente en un ambiente libre de patógenos por ratones *knock-out* del gen MDR1. En biopsias de pacientes con CUCI se determinó menor expresión de MDR1 en las muestras de pacientes con actividad en comparación con controles normales además de asociación con falta de respuesta al tratamiento convencional y con el curso clínico grave (Englund G. y cols. 2007. Yamamoto-Furusho JK. y cols. 2009).

Contario a lo observado en EII, la baja expresión o deficiencia de la Pgp y BCRP se propuesto como un factor protector contra el daño agudo de riñón en ratones (Ho GT. y col., 2005. Yamamoto-Furusho JK. 2009. Huls M. y cols. 2010).

En algunas patologías como la leucemia mieloide crónica se ha observado una marcada sobreexpresión de la MDR1/Pgp y MRP1. Específicamente es mayor la expresión de la Pgp en la fase temprana y en la fase avanzada, lo cual implica un manejo farmacológico de acuerdo al estadio de la patología (Vasconcelos FC. y cols. 2010).

## VI.- METODOLOGÍA



Figura 4: Diseño metodológico.

### **Líneas celulares**

Se emplearon las siguientes líneas celulares de cáncer de colon Caco-2, HT-29, HCT-116 y SW480 (las características se muestran en la tabla 3 y anexo 1), las cuales fueron mantenidas en medios de cultivo EMEM (Eagle's minimum essential medium) y Mc Coy's respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino y glutamina a una concentración de 2 mmol, 1% de antibiótico (10,000 unidades de penicilina y 10,000 µg de estreptomina por mililitro). Las células fueron incubadas con 2.5 ml de medio a 37°C bajo las condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en placas de 6 pozos. La línea celular CACO2 es una de las líneas de cáncer ampliamente empleada para estudiar el gen MDR1 ya que expresan altos niveles de expresión de este gen, mientras que la línea HT29 expresa muy bajos niveles por lo que en diversos estudios la sugieren como un adecuado control sobre todo en estudios en los que se evalúa regulación de la expresión de MDR1 por diversos agentes (Klamt F., y cols. 2008).

Tabla 3: Características de las líneas celulares

		<b>Edad</b>	<b>Genero</b>	<b>Patología</b>
CACO2	Caucásico	72 años	Masculino	Adenocarcinoma colorrectal
HT29	caucásico	44 años	Femenino	Adenocarcinoma colorrectal

### **Citocinas y lipopolisacáridos**

Con la finalidad de determinar si el proceso inflamatorio contribuye a la disminución de la expresión del gen MDR1 y la Pgp se indujo inflamación con TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  recombinantes humanas a una concentración de 10ng/ml, así como LPS (10ng/ml) de *Salmonella thypi*. Dicha concentración se ha descrito previamente como suficiente para generar inflamación. Cada una de las recombinantes y los LPS se agregaron por separado y posteriormente al cambio de medio (2ml). Con la finalidad de disminuir la variabilidad de resultados por factores externos a la inducción de inflamación y determinar la reproducibilidad de los datos, el proceso se realizó por triplicado en placas de 6 pozos en diferentes días a un 70% de confluencia para cada



uno de los tiempos (1, 6, 12 y 24 horas). Los niveles de inflamación se determinaron por la expresión del ARN mensajero de la IL6 e iNOS tanto para las células CACO como para las células HT29 como previamente se menciona.

#### ***Extracción de ARN mensajero y determinación de la integridad.***

Para determinar la integridad del ARN se preparó un gel de agarosa al 1% con 1.5  $\mu$ l de bromuro de etidio en una cámara de electroforesis. Se colocó una mezcla de 5  $\mu$ l de muestras y 3  $\mu$ l de colorante en cada pozo; ya colocadas las muestras se realizó la electroforesis en un periodo de 30 minutos a 60 volts. Terminado el ciclo el gel se colocó en el trasluminador (UVP TM-15 ®) y con la cámara fotográfica (Kodak 290 ®) que capturó la imagen.

#### ***Síntesis de ADN complementario***

Se realizó la mezcla de reactivos según el inserto para al síntesis de ADNc (kit Transcriptor First Standar ADNc synthesis de Roche ®). Ya mezclados se colocaron 10  $\mu$ l de la muestra de ARN en un tubo polipropileno para PCR de pared delgada (ependorff ®) de 0.2 ml y se le agregó 10  $\mu$ l de la mezcla de reacción previamente preparada, para obtener el equivalente a 3 tubos de reacción por cada muestra. Posteriormente se colocaron en el termociclador de PCR convencional (Gene Am PCR system 9600 Perkinelmer ®), bajo el programa de preincubación a 25 °C durante 10 minutos, incubación a 55 °C durante 30 minutos y un ciclo de saturación de la enzima a 72 °C por 5 minutos. Una vez terminado el ciclo los 3 tubos se mezclaron y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis de expresión.

#### ***Determinación de la expresión del ARN mensajero por PCR en tiempo real***

Se realizó PCR en tiempo real para determinar la expresión del gen MDR1 como gen blanco y como gen constitutivo se tomó el de la proteína larga ribosomal (RPLR0). Se empleo RPLR0 como gen constitutivo. Para determinar la expresión de IL-6 como marcadores de inflamación nuevamente se utilizó RPLR0 como gen de referencia. Se preparó la mezcla de reactivos de agua de PCR, mezcla de reactivos tipo Taq man, sonda número 18 para el gen MDR1 y la indicada para cada gen (para RPLR0

se empleó la sonda número 6 y para el gen de la IL-6 la sonda 38) de la librería de sondas High probe Library de Roche ®+e iniciadores sentido y antisentido (Amplio byosystem ®). Ya realizada la mezcla se tomaron 5 µl de la mezcla de reacción y 5 de la muestra (la muestra se trabajó con diluciones 1:5). La amplificación de cada gen se realizó en un equipo de PCR en tiempo real (Light Cyler 2.0 Roche ®) bajo 1 programa de desnaturalización ,45 ciclos de amplificación y 1 ciclo de enfriamiento (Anexo 8)

La secuencia de los iniciadores empleados es la siguiente:

MDR1	sentido: acagaaagcgaagcatggt antisentido: atggtggtccgaccttttc
iNOS	sentido: cacaggtctcttctggtttg antisentido: ttcttactgtggggcttg
IL6	sentido: tctgctcccacaatgaaacat antisentido: gatgccaggggaagacag
RPL0	sentido gaagctctatctcgctcca antisentido: agcaggcaacaccaggag

### ***Análisis de resultados***

Para determinar diferencia significativa de la expresión del gen MDR1, Pgp, iNOS e IL-6, entre los grupos de basal en comparación a 1 hora, 6 horas, 12 horas y 24 horas bajo los distintos tratamientos con TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y LPS, se realizó un análisis con pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney. Para determinar la correlación entre los niveles de expresión del ARN mensajero de MDR1 e iNOS en los diferentes tiempos de estímulo se realizó el análisis con correlación de Spearman. Se utilizo el paquete estadístico SPSS ver 15.0.

## VII.- RESULTADOS

### 7.1 Expresión del ARNm de MDR1 en células CACO2.

Para determinar si el proceso inflamatorio influye en la disminución de los niveles de expresión del gen MDR1 se emplearon recombinantes IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y lipopolisacáridos de *Salmonella typhi* para inducir inflamación en la línea celular CACO2 cuyos niveles de expresión del gen son superiores a otras líneas celulares de colon. Se determinó incremento significativo en la expresión del ARN mensajero de MDR1 de 1.48 y 1.51 veces a la hora y 6horas respectivamente bajo el estímulo con IL1 $\beta$  en comparación con el grupo basal. Al estimular la misma línea celular con recombinante de TNF $\alpha$  el incremento de 4.2, 3.5 y 4.9 veces la expresión se observa a las 6, 12 y 24 horas respectivamente. Sin embargo, se determinó disminución significativa de la expresión de MDR1 a partir de las 6 y hasta las 24 horas con respecto al basal en las células estimuladas con lipopolisacáridos de *Salmonella typhi*. Dichos resultados sugieren mecanismos diferentes de regulación de la expresión.

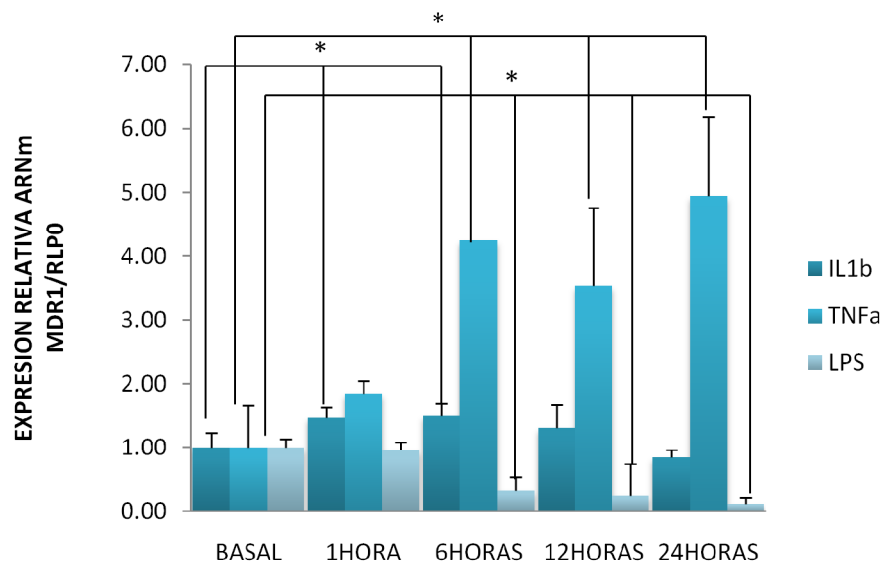


Figura 5: Expresión del ARNm del gen MDR1 en líneas celulares de colon estimuladas con recombinantes de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y LPS de *Salmonella typhi* a tiempos de 1, 6, 12 y 24 horas. Se emplea el gen RLP0 como gen de referencia. Como diferencia significativa se considero un valor de P<0.05 \*. Cada uno de los tiempos se realizó por triplicado.

### 7.2 Expresión del ARNm de la iNOS en células CACO2.

La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es un producto que resulta del proceso inflamatorio. Citocinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$  y el TNF $\alpha$ , así como los LPS de diferentes bacterias inducen la iNOS. En diversas líneas celulares se ha caracterizado como un factor de regulación de la expresión de MDR1/Pgp los niveles de óxido nítrico producido por la iNOS. En nuestro trabajo observamos incremento significativo de 4.0 y 2.0 veces de la expresión de la iNOS a las 6 y 12 horas respectivamente en células CACO2 estimuladas con recombinantes de IL1 $\beta$ , mientras que bajo el estímulo con TNF $\alpha$  observamos incremento significativo desde las 6 hasta las 24 horas de 1.7, 2.7 y 1.8 veces, ambos estímulos con respecto al basal. En células estimuladas con LPS *Salmonella typhi* no se determinó incremento en ningún intervalo de tiempo.

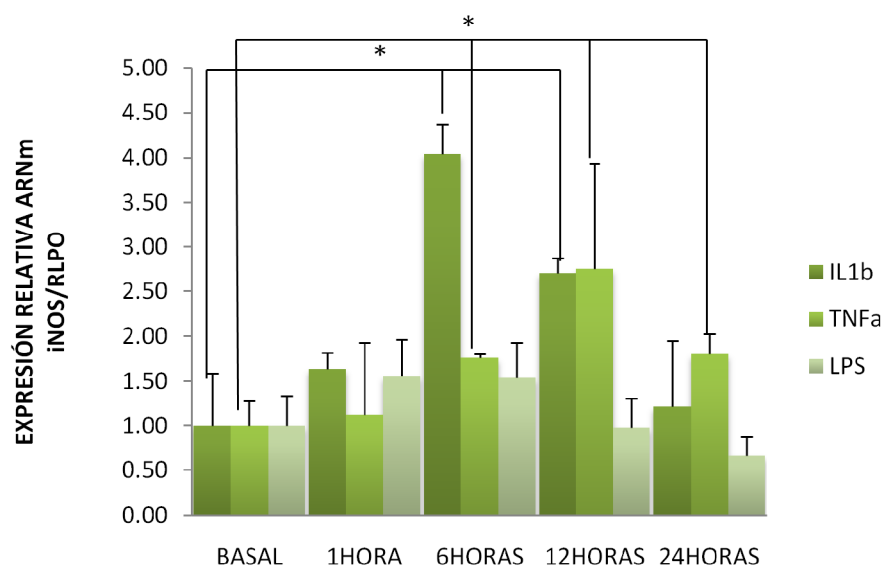


Figura 6: Expresión del ARNm del gen iNOS en líneas celulares CACO2 estimuladas con recombinantes de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y LPS de *Salmonella typhi* durante tiempos de 1, 6, 12 y 24 horas en comparación a un grupo basal sin estímulo. Se emplea el gen constitutivo o de referencia el gen RLP0. Como valor significativo se tomo un valor de P<0.05 \*. N. por cada grupo 3.

### 7.3 Expresión del ARNm de la IL6 en células CACO2.

Uno de los principales factores de transcripción implicados en el desarrollo del proceso inflamatorio y en la regulación de la expresión de MDR1 en diversos tipos celulares es NF $\kappa$ B. Se ha descrito que la activación de dicho factor de transcripción resulta de estímulos como la unión de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y LPS a sus respectivos receptores, generando la producción de citocinas proinflamatorias como la IL6. Al estimular las células CACO2 observamos incremento significativo de la expresión de la IL6 a partir de la hora y hasta las 24 horas del estímulo con IL1 $\beta$  (4.30, 6.40, 3.13, 3.85 veces con respecto al basal sin estímulo). Al estimular con recombinante de TNF $\alpha$  sólo observamos incremento significativo de 6.1 y 3.5 veces a la hora y 6 horas de incubación con dicho estímulo. Sin embargo, al incubar con LPS de *Salmonella typhi* solo fue significativo el incremento de 2.0 a la hora del estímulo, e inclusive no se determinó expresión de la IL6 a las 24 horas.

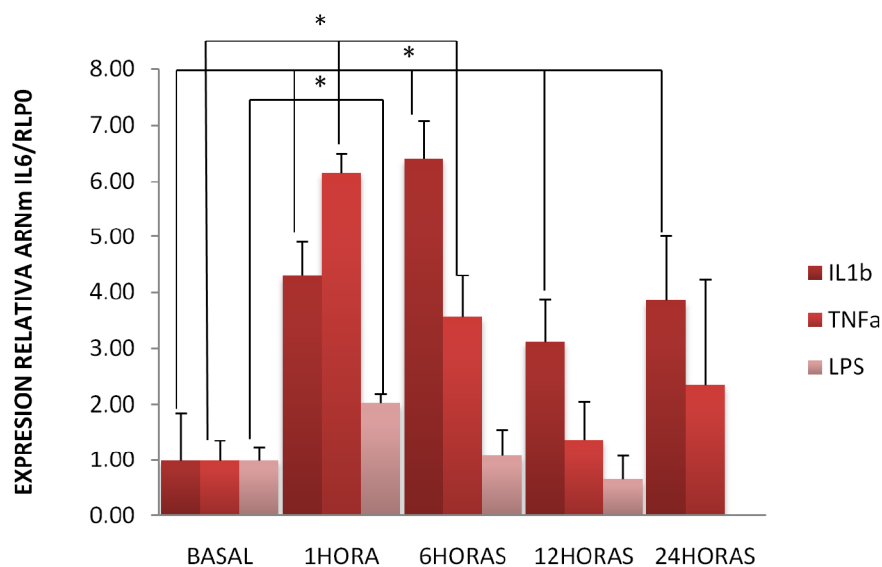


Figura 7: Expresión del ARNm del gen de la IL6 en líneas celulares de colon CACO2 estimuladas con recombinantes de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  y LPS de *Salmonella typhi* a tiempos de 1, 6, 12 y 24 horas. Se emplea el gen RLP0 como gen de referencia. Como diferencia significativa se considero un valor de P<0.05 \* con respecto al grupo basal. La determinación del ANR mensajero de cada uno de los grupos se realizo por triplicados (N=3) en diferentes días pero bajo las mismas condiciones.

### 7.4 Expresión del ARNm de MDR1 en células HT29.

La expresión del gen MDR1/Pgp se ha determinado en diferentes líneas celulares de colon, la línea celular HT29 se caracteriza por bajos niveles de expresión de MDR1/Pgp por lo que representa un buen control para determinar el incremento de la expresión al generar inflamación con recombinantes de IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  como previamente se ha reportado y observado en células CACO2. Al estimular las células con IL1 $\beta$  no se observó cambio significativo a ningún intervalo de tiempo. Solo se determinó incremento significativo de 3.1 veces con respecto al basal a las 24 horas. No se realizó estímulo con LPS de *Salmonella typhi* ya que éste se asocia con disminución de la expresión.

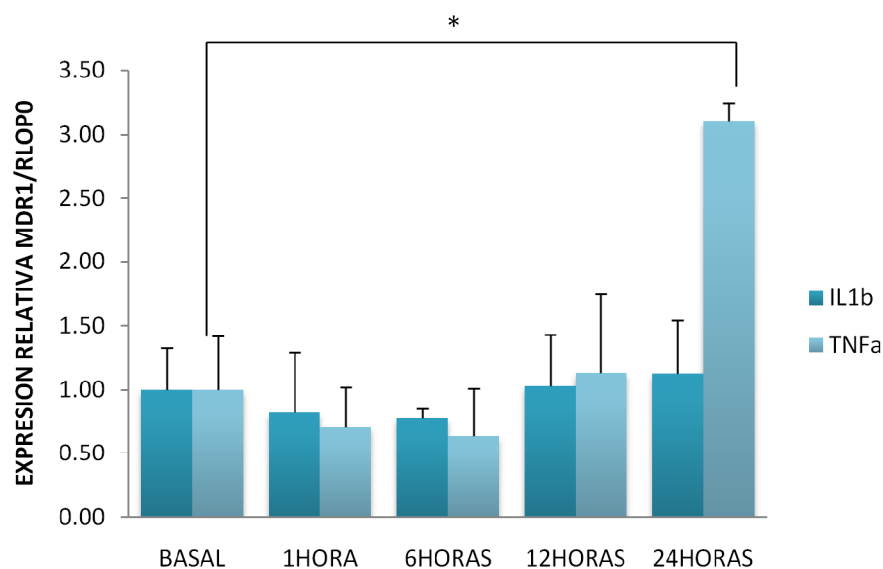


Figura 8: Expresión del ARNm del gen de la IL6 en líneas celulares de colon HT29 estimuladas con recombinantes de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  en intervalos de tiempo de 1, 6, 12 y 24 horas. Se emplea el gen RLP0 como gen de referencia. Como diferencia significativa se consideró un valor de  $P < 0.05$  \* con respecto al grupo basal. La determinación del ANR mensajero de cada uno de los grupos se realizó por triplicados bajo las mismas condiciones.

## VIII.- DISCUSIÓN

El gen de Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR1) y la Pgp se asocian con resistencia a fármacos en cáncer y en la EII, la baja expresión se asocia con un curso clínico más grave y falla en la respuesta al tratamiento médico. Para diversos grupos de investigación resulta de gran interés estudiar los factores que contribuyen a regular su expresión ya que los niveles de expresión influyen de manera diferente en diversas patologías (Walsh y cols, 2009. Vasconcelos FC. y cols. 2010. Yamamoto-Furusho JK. y cols. 2009).

En el cáncer las citocinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  están involucradas en el inicio, progresión y metástasis de tumores; en la CUCI los niveles de expresión de IL1 $\beta$  y TNF se encuentran elevados, mientras que los niveles de expresión de MDR1/Pgp se encuentran disminuidos. Además, se ha reportado a las citocinas proinflamatorias como reguladores de la expresión de MDR1/Pgp (Eglund G. y cols. 2007. Yamamoto-Furusho JK. y cols. 2010. Dixit S. y cols. 2005. Paduch A. y Kandefer-Szerszen M. 2009).

Para determinar cómo el gen MDR1 y su producto la Pgp son regulados durante la inflamación, analizamos el efecto de la IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y LPS en células epiteliales de colon CACO2 una línea de cáncer de colon que expresa altos niveles de MDR1 y células HT29 como control ya que sus niveles de expresión son considerablemente bajos. En diversos estudios la expresión del ARNm de la iNOS e IL6 son empleados como marcadores de inflamación, además resultan de la activación de las principales vías de señalización que regulan la expresión de MDR1.

Al estimular las células CACO2 con 10 ng/ml de TNF $\alpha$  observamos incremento significativo a las 6, 12 y 24 horas de incubación. Datos similares fueron determinados por Yu C. y colaboradores quienes observaron incremento de la expresión del mensajero, proteína y función de MDR1 en células endoteliales de cerebro al ser estimuladas con TNF $\alpha$  a una concentración de 5 ng/ml en tiempos de

2, 6 y 24 horas (Yu C. y cols. 2007). Posteriormente caracterizaron un sitio de unión para el factor de transcripción NF $\kappa$ B en el promotor del gen Mdr1 de las mismas células, a través del cual se promueve la sobreexpresión de Mdr1 por el estímulo con TNF $\alpha$ , lo cual se comprobó al realizar una mutación en el sitio de unión para NF $\kappa$ B y estimular con TNF $\alpha$ . No se reportó incremento de la expresión de Mdr1, esto sugiere un sitio de unión para NF $\kappa$ B en células de cáncer de colon (Yu C. y cols. 2008). Otro grupo de investigación realizó estímulos con 200ng/ml de TNF $\alpha$  en células epiteliales de mama (BME-UV) durante 24, 72 y 120 horas. Ellos determinaron incremento significativo en cada uno de los tiempos con respecto a un grupo de células sin estímulo. Sin embargo, se ha reportado en células HCT116 y otros tejidos un comportamiento opuesto, es decir disminución de la expresión del ARNm de MDR1 (Al-Bataineh MM. y cols, 2010).

El grupo de von Wedel Parlow y colaboradores determinaron incremento de la Pgp pero no del ARNm de mdr1 al estimular células endoteliales de cerebro de cerdo con 10ng/ml de recombinantes de TNF $\alpha$  recombinante, lo que sugiere un mecanismo post-transcripcional en la regulación de la expresión de MDR1 (von Wedel Parlow, y cols. 2009). Mientras que el grupo de Poller determinó incremento significativo del ARNm de MDR1 y la Pgp después del tratamiento con TNF $\alpha$  (20 ng/ml x 72 hrs.) y no mostró cambios significativos bajo el estímulo con IL1 $\beta$  (2ng/ml x 72 hrs.) en células endoteliales inmortalizadas de cerebro de humano. Sin embargo, el transporte de la rodamina 123 no mostró cambios bajo la influencia de ninguna de las 2 citocinas lo que sugiere incremento de la expresión de MDR1/Pgp pero no de su función (Poller B. y cols. 2010).

Contrario a lo observado en nuestro trabajo el grupo de Evseenko D. y colaboradores determinaron en trofoblasto la expresión del mensajero y la proteína de MDR1 estimuladas durante 12 y 48 horas con TNF $\alpha$  (20 ng/ml) e IL1 $\beta$  (2ng/ml), observando disminución del mensajero en un 45 y 50% respectivamente (Evseenko A. y cols. 2007). El mismo fenómeno fue reportado por Belliard y colaboradores en 2004, al determinar disminución de la expresión del mensajero de MDR1 en células CACO2



tras 48 horas de estímulo con recombinante de  $TNF\alpha$  a una concentración de 10ng/ml (Belliard AM. y cols., 2004).

Múltiples grupos de investigación han estudiado el efecto del estímulo con  $TNF\alpha$  sobre la expresión de MDR1 reportando resultados diferentes por lo que se ha propuesto que la regulación de MDR1 por  $TNF\alpha$  depende de la concentración y del tipo de celular (Yu C. y cols., 2008. Al-Bataineh MM. y cols, 2010).

La  $IL1\beta$  ha sido ampliamente empleada para inducir inflamación en diferentes grupos celulares. Al igual que el estímulo con  $TNF\alpha$ , observamos incremento de la expresión del ARNm de MDR1, sólo que a diferencia del estímulo con  $TNF\alpha$ , el incremento fue más rápido a 1 y 6 horas. Sin embargo, no continuó a las 12 y 24 horas. Se ha caracterizado que la unión de la  $IL1$  a su receptor genera la activación de  $NF\kappa B$ , a través de la activación de  $NF\kappa B$  inicia la transcripción de una gran variedad de genes involucrados en la inflamación, así como la expresión de iNOS (Bujak M. y Frangogiannis NG. 2009). Recientemente Kaler demostró que la  $IL1\beta$  induce la señalización de Wnt en células de cáncer de colon de manera dependiente de  $NF\kappa B/AKT$ . Diversos experimentos indican interacciones entre Wnt y AKT la cual estimula la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina/TCF fosforilandola e incrementado su acumulación nuclear (Kaler P. y cols., 2009). En células de cáncer de ovario se ha demostrado la regulación de la expresión de MDR1/Pgp a través de la unión de la  $\beta$ -catenina a las regiones TCF/LEF del promotor de MDR1 (Liu YY. y cols. 2010). Otro hallazgo que apoya este posible incremento en la expresión lo reportó Liu Y. y su grupo de trabajo quienes observaron incremento de la expresión de MDR1 por la glucosilceramida sintasa a través de la vía cScr y  $\beta$ -catenina. Se había mencionado con anterioridad la región promotora de MDR1 tiene sitios de unión para  $\beta$ -catenina/TCF por lo que podría explicar el incremento de MDR1 por el estímulo con  $IL1\beta$ .

Los múltiples sitios de unión en el promotor de MDR1 para diferentes factores de transcripción incrementan el número de posibles candidatos reguladores de su expresión la  $\beta$ -catenina/TCF por lo que podría explicar el incremento de MDR1 por el estímulo con IL1 $\beta$ .

Una de las vías de activación de NF $\kappa$ B es a través del reconocimiento de moléculas de bacterias por receptores membranales como el TLR4. En nuestro trabajo empleamos LPS de *Salmonella typhi* para inducir inflamación a una concentración de 10  $\mu$ g/ml. El grupo de Heemskerk determinó un incremento significativo de la Pgp tras 24 horas de exposición al estímulo 10  $\mu$ g/mL de LPS (Heemskerk S. y cols., 2010). Pan y colaboradores en su estudio con barrera hematoencefálica de ratas knockout de NF $\kappa$ B y silvestre estimuladas con LPS (2.5 mg/kg de peso) durante 48 horas, determinaron un incremento en los niveles del ARN mensajero de MDR1 en las ratas wildtype en comparación con las ratas knockout, lo que sugiere un efecto directo del factor de transcripción NF $\kappa$ B sobre los niveles de expresión de MDR1 ya que la activación de NF $\kappa$ B se promueve tras la unión del LPS a receptores como el TLR4 o CD14 así como la unión de TNF $\alpha$  a su receptor como se menciona en trabajos anteriores (Pan W. y cols. 2010).

En nuestro trabajo determinamos disminución de la expresión del ARNm de MDR1 a partir de las 6 horas de incubación con *S. typhimurium*. Un comportamiento similar fue descrito en un estudio realizado por Siccardi en células de cáncer de colon HCT8 y T84 infectadas con *S. typhimurium*; observaron incremento de la acumulación intracelular de rodamina 123 y digoxina, ambos fármacos son sustratos de la Pgp lo cual sugiere disminución de la expresión de esta proteína (Siccardi D. y cols. 2008). La disminución de la expresión de MDR1/Pgp en las células estimuladas con LPS de *Salmonella typhi* probablemente es independiente de los niveles de expresión de la iNOS ya que los cambios en la expresión del ARNm de ésta no resultaron significativos en ningún intervalo de tiempo.

El óxido nítrico producido por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es un producto que resulta del proceso inflamatorio. Citocinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  inducen la iNOS (Heemskerk S. y cols. 2007. Takizawa Y. y cols. 2010). Además estas citocinas pueden activar factores de transcripción como NF $\kappa$ B que activan genes específicos e inclusive la iNOS, la producción de óxido nítrico (NO) se ha asociado con la pérdida de las propiedades de barrera de la mucosa intestinal facilitando la invasión por bacterias e inclusive estudios realizados en células CACO2 estimuladas con 10ng/ml de recombinante de IFN- $\gamma$  recombinante demostraron que el efecto que puede realizar la citocina sobre los niveles de NO afecta la unión de NF $\kappa$ B al ADN y modificar la expresión de la Pgp (Dixit SG. y cols. 2004). En múltiples estudios la iNOS ha sido empleada como marcador de inflamación, además han demostrado que los niveles de NO producido por la iNOS tienen un efecto directo sobre la expresión de MDR1/Pgp. Nosotros determinamos incremento significativo de la iNOS a las 6 y 12 horas posterior al estímulo con IL1 $\beta$  y a las 6,12 y 24 al estimular con TNF, pero no se observó incremento significativo al estimular con LPS contrario a lo obtenido en muestras de tejido de riñón de rata donde se determinó incremento de la expresión del gen *abcb1* y la Pgp al inducir inflamación con LPS de *Escherichia coli* a partir de las 3 horas y hasta las 12 y 24 horas. La coadministración de aminoguanidina (inhibidor de la iNOS) bloqueó el incremento de la expresión (Heemskerk S. y cols. 2007). Lo cual sugiere al óxido nítrico producido por la iNOS como un factor que puede regular la expresión de MDR1 y la Pgp.

Recientemente en un estudio realizado en células de cerebro de rata el TNF $\alpha$  se une a su receptor generando la liberación de ET-1 que se une a su receptor ET $_B$  continuando la cascada de señalización vía iNOS y proteína cinasa C (PKC). Tras un largo periodo de estimulación con TNF $\alpha$  (6h) resulta la activación de NF $\kappa$ B por la PKC e incremento de la Pgp como se ha demostrado en diversas líneas celulares e inclusive nuestros resultados sugieren el mismo efecto ya que la incubación con TNF $\alpha$  incrementó significativamente la expresión de MDR1 y la iNOS en los mismos periodos de tiempo de 6-24 horas (Bauer B. y cols. 2007). Colabufo y colaboradores

en 2010 confirman la activación de MDR1 y la Pgp por el NO en células de cáncer de colon CACO2 como respuesta a la activación NF $\kappa$ B dependiente de la iNOS.

El efecto del óxido nítrico en la expresión de la Pgp ha sido estudiado por diferentes grupos de investigación los cuales son controversiales ya que tanto el incremento como la disminución de la expresión de MDR1/Pgp han sido reportados. Sin embargo, la diferencia parece radicar en el proceso y condiciones de generación de óxido nítrico (Takizawa Y. y cols. 2010).

Como anteriormente se menciona el factor de transcripción NF $\kappa$ B parece jugar un papel importante en la regulación de la expresión de MDR1 y la Pgp tanto en los estímulos con TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , ya que lo reportado en la literatura aporta estos datos. Algunos estudios sugieren que la regulación en la expresión de genes por NF $\kappa$ B depende del contexto celular de su vía de activación y de la interacción con otras vías de señalización (Yeruva S. y cols. 2008). Otro de los productos de la activación de NF $\kappa$ B es la IL6 la cual se reportó incremento en todos los tiempos (1-24 horas) al estimular con IL1 $\beta$ ; sin embargo, el incremento de MDR1 sólo se observó a 1 y 6 horas por lo que sugiere que el incremento de MDR1 es independiente de NF $\kappa$ B ya que este induce a la IL6. El mayor nivel de expresión de IL6 durante el estímulo con TNF $\alpha$  se observó a 1 y 6 horas y para LPS sólo a 1 hora de incubación, sin embargo, no se reportó incremento significativo de MDR1 en ninguno de estos intervalos de tiempo esto implica un mecanismo de regulación independiente NF $\kappa$ B/IL6.

En resumen son múltiples los factores que están involucrados en la regulación de la expresión de MDR1/Pgp como: la concentración del agente con que se induce el estímulo, las vías de señalización, el tipo celular, los tiempos de exposición y la cantidad de receptores que reconocen cada uno de los estímulos. De tal manera que se requieren más estudios que involucren la inhibición de las principales vías de regulación así como de los receptores para determinar el mecanismo que activa cada estímulo para generar incremento o disminución de la expresión de MDR1/Pgp.

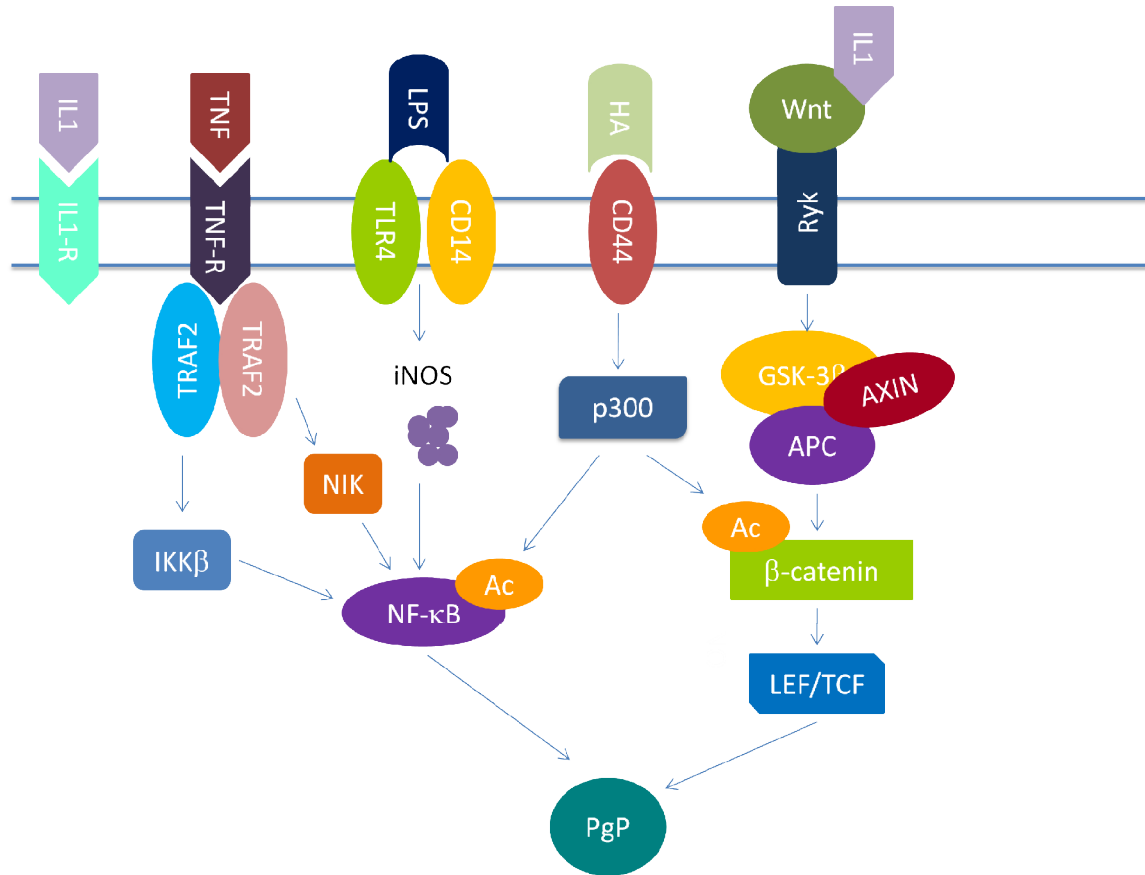


Figura 9: Vías de señalización y factores de transcripción caracterizados en diferentes líneas celulares involucrados en la regulación de la expresión de MDR1/Pgp.

## ***IX.- CONCLUSIONES***

En la línea celular CACO2 determinamos incremento de la expresión de MDR1 al estimular con  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  mientras que al estimular con LPS observamos disminución de MDR1. En las células HT29 estimuladas con  $TNF\alpha$  se observó incremento de MDR1 en tiempos prolongados (6-24 horas). La iNOS se incremento de manera significativa sólo para los estímulos con  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  a partir de las 6 horas, mientras que la IL6 incrementó desde la hora y se mantuvo hasta las 24 horas, contrario a lo observado al estimular con LPS y  $TNF\alpha$  donde solo se observó que a la 1 y 6 horas.

La expresión del ARN mensajero del gen MDR1 parece estar determinada por el agente con el cual se induce inflamación o la expresión de sus receptores ( $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  y lipopolisacáridos de *Salmonella typhi*), así como las vías de señalización que cada uno de estos podría estar activando. Sin embargo, los algunos factores de transcripción probablemente también son los responsables de contribuir a generar las diferencias en los niveles de expresión de MDR1/Pgp en los diferentes intervalos de tiempo.

Dado que solo se determinó la expresión del ARN mensajero de MDR1/Pgp, resulta sumamente importante la determinación de la expresión de la proteína y realizar estudios de función de la misma, así como, realizar estudios de señalización que contribuyan a determinar los posibles mecanismos que podrían repercutir sobre la expresión de MDR1/Pgp.

### VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Al-Bataineh MM., Van der Merwe D., Schultz BD. y Gehring R. Tumor necrosis factor alpha increases P-glycoprotein expression in vitro model of mammary epithelial cells. *Biopharm. Drug. Dispos.* 2010. 31: 506-515.
- Ambudkar SV., Kimchi-Sarfaty C., Sauna ZE. y Gottesman MM. P-glycoprotein: from genics to mechanism. *Oncogen.* 2003. 22: 7468-7485.
- Annese, V., Valvano, M. R., Palmieri, O., Latiano, A., Bossa, F. y Andriulli, A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2006. 12(23): 3636-3644.
- Bauer B., Hartz AM. y Miller DS. Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increased P-glycoprotein expression and transport activity at blood-brain barrier. *Mol Pharmacol.* 2007. 71: 667-675.
- Belliard AM., Lacour B., Farinotti R. y Leroy C. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on intestinal P-glycoprotein expression, activity and localization in CACO-2 cells. *Journal of Pharmaceutical sciences.* 2004. 93(6): 1524-1536.
- Bertilsson PM., Olsson P y Magnusson K-E. Cytokines influence mRNA expression of cytochrome P450 3A4 and MDR1 in intestinal cells. *J Pharm Sci.* 2001. 90(5): 638-646.
- Blokzijl H., Vander Borgh S., Bok LI, Libbrecht L., Geuken M., van den Heuvel FA., Dijkstra G., Roskams TA., Moshage H., Jansen PL. y Faber KN. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels. *Inflamm Bowel Dis.* 2007. 13: 710-720.
- Bodor, M., Kellyy, E. J. y Ho, R.J. Characterization of the Human MDR1 Gene. *The AAPS Journal.* 2005. 7(1): E1-E5.
- Bourguignon L., Xia W. and Wong G. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates  $\beta$ -catenin signaling and NF $\kappa$ B-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-x<sub>L</sub> gene expression and chemoresistance in breast tumor cells. *J Biol Chem.* 2009. 284(5): 2657-2672.
- Bruyère A., Declèves X., Bouzom F., Ball K., Marques C., Treton X., Pocard M., Valleur P., Bouhnik Y., Panis Y., Scherrmann J.M. y Mouly S. Effect of variations in the Amounts of P-Glycoprotein (ABCB1), BCRP (ABCG2) and CYP3A4 along

- the human small intestine on PBPK models for predicting intestinal first pass. *Molecular Pharmaceutics*. 2010. 7(5): 1596-160.
- Bujak M. y Frangogiannis NG. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp*. 2009. 57(3): 165-176.
  - Chow EC., Sondervan M., Jin C., Groothuis GMM. y Pang KS. Comparative effects of dexercalciferol ( $1\alpha$ -Hydroxyvitamin D<sub>2</sub>) versus calcitrol ( $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamina D<sub>3</sub>) on the expression of transporters and enzymes in the rat *in vivo*. *J Pharm Sci*. 2011. 100(4): 1594-1604.
  - Chowbay, B., Sharma, A., Sivathasan, C. y Lee D. J. E. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in Asian population: phenotypic correlates. *J Clin Pharmacol*. 2002. 56: 78-83.
  - Colabufo NA., Contino M., Berardi F., Perrone R., Panaro MA., Cianciulli A., Mitolo V., Azzariti A., Quatrone A. y Paradiso A. A new generation of MDR modulating agents with dual activity: P-gp inhibitor and iNOS inducer agents. *Toxicology In Vitro*. 2011. 25(1): 220-230..
  - Dean, M., Rzhetsky, A. y Allikmets R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res*. 2001. 11: 1156-1166.
  - Dean, M., Hamon, Y. y Chimini G.. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*. 2001. 42:1007-1017.
  - Ding S., Chamberlain M., McLaren A., Goh L-b., Duncan I. y Wolf CR. Cross-talk between signaling pathways and the multidrug resistant protein MDR-1. *British Journal of Cancer*. 2010 85(8): 1175-1184.
  - Dixti SG., Zingarelli B., Buckley DJ., Buckley AR. y Pauletti GM. Nitric oxide mediates increased P-glycoprotein activity in interferon- $\gamma$ -stimulated human intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004. 288: G533-540
  - Eberding A., Rehm V. y Lee CH. Detection of mRNA degradation intermediates in tissues using the 3'-end poly(A)-tailing polymerase chain reaction method. *Analytical Biochemistry*. 2004. 335: 58-65..
  - El-Khoury V., Breuzard G., Fourré N. y Dufer J. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR1 (ABCB1) gene expression by a



transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model. *British Journal of Cancer*. 2007. 97(4): 562-573.

- Englund G., Jacobson A., Rosean F., Artursson P., Kindmark A. y Rönnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis*. 2007. 13:291-297
- Enokida H., Shiina H., Urakami S., Terashima M., Ogishima T., Li L., Kawahara M., Nakagawa M., Kane CJ., Carroll PR., Igawa M. y Dahiya R. Smoking influences aberrant CpG hypermethylation of multiple genes in human prostate carcinoma. *Cancer*. 2006. 106: 79-86.
- Evseenko DA., Paxton JW. y Keelan JA. Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placenta trophoblasts by cytokines, steroids and growth factors. *Drug Metab Dispos*. 2007. 35(4):595-601
- Farrel, R. J. y Kelleher D. Mechanism of esteroid action and resistance in inflammation. *Journal of Endocrinology*. 2003. 178:339-346.
- Fernandez C., Buyse M., German-Fattal M. y Gimenez Françoise. Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J Pharmaceut Sci*. 2004. 7(3): 359-371.
- Gómez-Martínez A., García-Morales P., Carrato A., Castro-Galache MD., Soto JL., Carrasco-Bautista E., Gracia-Bautista M., Guaraz P., Ferragut JA. y Saceda M. Post-transcriptional regulation of P-glycoprotein expression in cancer cell lines. *Mol Cancer Res*. 2007. 5(6): 641-654.
- Hauswald S., Duque-Alfonso Jesus., Wagner MM., Schertl FM., Lübbert M., Peschel C., Keller U. y Licht T. Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple ABC transporter genes. *Clin Cancer Res*. 2009. 15(11): 3705-3715.
- Hayashi Y., Ushijima K., Ando H., Yanagihara H., Ishikawa E., Tsuruoka S., Sugimoto K. y Fujimura A. Influence of a time-restricted feeding schedule on the daily rhythm of abcb1a gene expression and its function in rat intestine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010. 335(2):418-23.

- Heemskerk S., Peters JGP., Louisse J., Sagar S., Russel FGM. y Masereeuw R. Regulation of P-glycoprotein in renal proximal tubule epithelial cells by LPS and TNF- $\alpha$ . *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010.
- Heemskerk S., van Koppen A., van der Broek L., Poelen GJ., Wouteres AC., Dijkman HB., Russel FG. y Masereeuw R. Nitric oxide differentially regulates renal ATP-binding cassette transporters during endotoxemia. *Eur J Physiol*. 2007. 454: 321-334.
- Herui Y., Zhaohui D., Minghui W., Awoniyi OA., Dean R. y Yufen X. Adrenaline induces chemoresistance in HT29 colon adenocarcinoma cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009. 190(2): 81-89.
- Hien TT., Kim HG., Han EH., Kang KW. y Jeong HG. Molecular mechanism of MDR1 by puerarin from pueraria lobata via NF- $\kappa$ B pathway and cAMP-responsive element transcriptional activity-dependent up-regulation of AMP-activated protein kinase in breast cancer MCF-7/adr cells. *Mol Nutr Food Res*. 2010. 1:1-11.
- Ho G-T., Gaya D. R. y Satsangi, J. Multidrug Resistance (MDR1) Gene in Inflammatory Bowel Disease: A Key Player?. *Inflamm Bowel Dis*. 2005. 11(11):1013-1019.
- Huebner C., Petermann I., Lam WJ., Shelling A., Ferguson LR. Characterization of single-nucleotide polymorphisms relevant to inflammatory bowel disease in commonly used gastrointestinal cell lines. *Inflamm Bowel Dis*. 2010. 16(2): 282-295.
- Huls M., Schoeber JP., Verfaillie CM., Luttun A., Ulloa-Montoya F., Menke AL., van Bolderen L., Woestenenk RM. Merckx GF., Wetzels JF., Russel FG. y Masereeuw R. Deficiency of either p-glycoprotein or breast cancer resistance protein against acute kidney injury. *Cell Transplantation*. 2010. 19: 1195-1208.
- Huo H., Magro PG., Pietsch EC., Patel BB. y Scoto KW. Histone methyltransferase MLL1 regulates MDR1 transcription and chemoresistance. *Cancer Res*. 2010. 70(21): 87268735.
- Ishikawa, T., Hirano, H., Onishi, Y., Sakura, A. y Tarui, S. 2004. Functional Evaluation of ABCB1 (P-Glicoprotein) Polymorphisms: Hig-Speed Screening and Structure-Activity Relationship Analysis. *Drug Metab Pahrmacokin*. 19(1): 1-14.

- Johnson, R., A., Shepard, E., M. y Scotto, K.W. Differential Regulation of MDR1 Transcription by the p53 Family Members. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2005. 280(14): 13213. 13219.
- Jin L. Li J., Nation JL. y Nicolazzo JA. The impact of P-glycoprotein inhibition and lipopolysaccharide administration on the blood-brain barrier transport of colistin in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011. 55(2):502-7
- Jin W. Lui Y., Xu S., Yin W., Lj. Yang J. y Shao Z. UHRF1 inhibits MDR1 gene transcription and sensitizes breast cancer cells to anticancer drugs. *Breast Cancer Res Treat*. 2010. 124(1):39-48.
- Kaler P., Godasi BN., Augenlicht L. y Klampfer L. The NF- $\kappa$ B/AKT-dependent induction of WNT signaling in colon cancer cells by macrophages and IL-1 $\beta$ . *Cancer Microenvironment*. 2009. 2: 69-80.
- Klamt F., Passos DT., Castro MA., Gelain DP., Grivicich I. y Moreira JC. Inhibition of MDR1 expression by retinol treatment increases sensitivity to etoposide (VP16) in human neoplastic cell line. *Toxicology in invitro*. . 2008. 22:873-878.
- Kimchi-Sarfaty C., Oh M. J., In-Wha K., Sauna E. Z., Calcagno A.M., Ambudkar S. V. y Gottesmant M. A %Silent+ Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science*. 2007. 315: 525-528
- Konieczna A., Lichnovka R., Er dosova B. y Ehrmann J. The role of PPARs in MDR . a lesson from embryonic development. *Neoplasma*. 2009. 56(4): 279-283.
- Kota BP., Tran VH., Allen J., Bebawy M. y Roufogalis BD. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells. *Pharmacological Research*. 2010. 62:426-431.
- Le Goff W., Settle M., Greene DJ., Morton RE. y Smith JD. Reevaluation of the role of the multidrug-resistant P-glycoprotein in cellular cholesterol homeostasis. *J Lipid Res*. 2006. 47(1):51-8.
- Lee CH., Rehaume VE. y Shandro J. Identification of in vivo P-glycoprotein mRNA decay intermediates in normal liver but not in liver tumors. *Journal of Cellular Physiology*. 2005. 204: 638-645.
- Leschziner, G., Zabaneh, D., Pirmohamed, M., Owen, A., Rogers, J., Coffey, A., Balding, D., Bentley, D. y Johnson, M. Exon sequencing and hig resolution

- haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*. 2006. 16(6): 439-450.
- Leslie EM., Deeley RG. y Cole SPC. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. 204: 216-237.
  - Liu YY., Gupta V., Patwardhan GA., Bihinge K., Zhao Y., Bao J., Mehendale H., Cabot MC., LI YT. y Jazwinski SM. Glucosylceramide synthase upregulates MDR51 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and  $\beta$ -catenin signaling. *Mol Cancer*. 2010 9:145.
  - Loo, T. W., M. Bartlett, M. C y Clarke D. M. Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket. *Biochem. J*. 2006. 396: 537. 545.
  - Matsuo M. ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2010 74(5): 899-907.
  - Marguerite V., Beri-Dexheimer M., Ortiou S. Guéant JL. y Merten M. Cobalamin potentiates vinblastine cytotoxicity through downregulation of mdr-1 gene expression in HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2007. 20: 967-976.
  - Mercado-Lubo. R. y McCormick BA. The interaction of gut microbes with host ABC transporters. *Gut Microbes*. 2010. 1(5): 301-306.
  - Miller DS. Regulation of P-glycoprotein and other ANC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci*. 2010. 31(6): 246-254.
  - Owira PM. y Ojewole JA. The grapefruit: an old wine in a new glass? Metabolic and cardiovascular perspectives. *Cardiovascular Journal of Africa*. 2010. 21(5): 280-284.
  - Paduch R. y Kandefer-Szerszen M. Transforming growth factor- $\beta$ 1 and acetylcholine (ACh) alter nitric oxide (NO) and interleukin-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) secretion in human colon adenocarcinoma cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol*. 2009. 45:543-550.
  - Pan W., Yu C., Hsuchou H y Kastin AJ. The role of cerebral vascular NF $\kappa$ B in LPS-induced inflammation: differential regulation of efflux transporter and transporting cytokine receptors. *Cell Physiol Biochem*. 2010. 25(6): 623-630.

- Paredes, L. A., Blanco, J. L. y Echenique-Elizondo, M. Expresión de las proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. *Cir Esp.* 2006. 79(4): 202-214.
- Poller B., Drewe J., Krähenbühl S., Huwylar J. and Gutmann H. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol.* 2010. 30: 63-70
- Rodrigues AC., Curi R., Hirata MH. y Hirata RD. Decreased ABCB1 mRNA expression induced by atorvastatin results from enhanced mRNA degradation in HepG2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 2009. 37(3-4): 486-491.
- Ruiz, G., M., J. Souviron, R., A. y Martínez, M.M. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *AN.MED. INTERNA.* 2002. 9(9): 477-485.
- Saksena S., Goyal S., Raheja G., Singh V., Akhtar M., Nazir TM., Alfehai WA., Gill RK. y Dudeja PK. Upregulation of P-glycoprotein by probiotics in intestinal epithelial cells and in dextran sulfate sodium model of colitis in mice. *AJP-Gastrointest Liver Physiol.* 2011. 300: G1115-G1123.
- Sauna ZE. Y Ambudkar SV. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther.* 2007. 6(1): 13-23.
- Scotto, K. W. y Johnson, R. A. Transcription of the multidrug resistance Gene MDR1: Atherapeutic Target. *Molecular interventions.* 2001. 1(2): 117-125.
- Sengupta S., Mantha AK., Mitra S. y Bhakat KK. Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1.p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1. *Oncogene.* 2011. 27;30(4):482-493.
- Shareef MM., Brown B., Shajahan S., Sathishkumar S., Arnold SM., Mohiuddin M., Ahmed MM. y Spring PM. Lack of P-glycoprotein expression by low-dose fractionated radiation results from loss of nuclear factor- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B activation in oral carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2010. 6(1): 89-89.
- Sheps, J. A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D. L. y Ling V. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary

- dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biology* 2004. 5(3): R15.1-R15.17.
- Siccardi D., Mumy KL., Wall DM., Bien JD. y McCormick BA. Salmonella enteric serovar Typhimurium modulates P-glycoprotein in intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011. 294(6):G1392-G1400.
  - Silva R., Carmo H., Dinis-Olivera R., Cordeiro-da-Silva A., Costa Lima S., Carvalho F., M. de Lourdes Bastos y Remiao F. In vitro study of P-glycoprotein inductions as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in CACO-2 cells. *Arch Toxicol.* 2010. 85(4):315-26.
  - Takakura Y., Hinoi T., Oue N., Sasada T., Kawaguchi Y., Okajima M., Akyol A., Fearon ER., Yasui W. y Ohdan H. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res.* 2010. 70(17): 6767-6779.
  - Takizawa Y., Kishimoto H., Kitazato T., Tomita M. y Hayashi M. Effect of nitric oxide on mucosal barrier dysfunction during early phase of intestinal ischemia/reperfusion. *Eur J Pharm Sci.* 2011. 42(3): 246-252.
  - Tahara T., Shibata T., Nakamura M., Yamashita H., Yoshioka D., Okubo M., Maruyama N., Kamano T., Kamiya Y., Nakagawa Y., Fujita H., Nagasaka M., Iwata Y., Takahama K., Watanabe M., Hirata I y Arisawa T. Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis. *International Journal of molecular medicine.* 2009. 23:521-527.
  - Tang Y., Li D., Sun F. Li L. y Yu D. P-glycoprotein regulating biphasic insulin secretion in rat pancreatic beta cells. *Chin Med J.* 2009. 122(21): 2587-2592.
  - Tae-Bum L., Park JH., Min YD., Kim KJ. y Choi CH. Epigenetic mechanisms involved in differential MDR1 mRNA expression between gastric and colonic cancer cell lines and rationales for clinical chemotherapy. *BMC Gastroenterology.* 2008. 8(33): 8-14.
  - Tian K., Wang Y., Huang Y., Sun B., Li Y. y Xu H. Methylation of WTH3, a possible drug gene, inhibits p53 regulated expression. *BMC Cancer.* 2008. 8:327-340.

- Van der Deen M., Timens W., Timmer-Bosscha H., van der Strate BW., Scheper RJ., Postma DS., de Vries EG. y Kerstjens HA. Reduced inflammatory response in cigarette smoke exposed mdr1/mdr1a/mdr1b deficient mice. *Respiratory Research*. 2007. 8(49)
- Vasconcelos FC., Silva KL., Silva de Souza P., Silva LFR., Moellmann-Coelho A., Klumb CE. y Maia CR. Variation of MDR proteins expression and activity levels according to clinical status and evolution of MCL patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011. 80(3): 158-166.
- Verhalen B. y Wilkens S. P-glycoprotein retains drug stimulated ATPase activity upon covalent linkage of the two nucleotide binding domains at their C-terminal ends. *J Biol Chem*. 2011. 286(12):10476-82.
- von Wedel-Parlow M., Wölte P. y Galla HJ. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem*. 2009. 111: 111-118.
- Wang D. y Sadée, W. Searching for polymorphisms that affect gene expresión and mRNA processing: Example ABCB1 (MDR1). *The AAPS Journal*. 2006. 8(3): E515-E520.
- Wu H., Hait W. N. y Yang J-M. Small Interfering RNA-induced Suppression of *MDR1* (P-Glycoprotein) Restores Sensitivity to Multidrug-resistant Cancer Cells<sup>1</sup>. *Cancer Research* 2003. 63:1515. 1519.
- Yagüe, E., Artesilla A. L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C. F. y Raguz, S. P-glycoprotein (*MDR1*) Expression in Leukemic Cells Is Regulated at Two Distinct Steps, mRNA Stabilization and Translational Initiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. 278(12):10344-10352.
- Yamamoto-Furusho JK., Villeda-Ramírez MA., Fonseca-Camarillo GC., Sánchez-Muñoz F., Domínguez-López A., Barreto-Zúñiga R. y Uribe M. Hig gene expression of MDR1 (ABCB1) is associated with medical treatment response and long-term remission in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009.
- Yao H., Duan Z., Wang M., Awonuga A. O., Rappolee D. y Xie Y. Adrenaline induces chemoresistance in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009. 190: 81-78.



- Yeruva S., Ramadori G. y Raddatz D. NF- $\kappa$ B-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  in human intestinal epithelial cell lines. *Int J Colorectal Dis.* 2008. 23:305-317.
- Yu C., Kastin AJ., Tu H., Waters S. y Pan W. TNF activates P-Glycoprotein in cerebral microvascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2007. 20:853-858.
- Yu C., Argyropoulos G., Zhang Y., Kastin AJ., Hschou H. y Pan W. Neuroinflammation activates efflux transport by NF $\kappa$ B: promoter analysis in BBB endothelia. *Cell Physiol Biochem.* 2008. 22(5-6): 745-756.
- Zaho Y., Lui J., Hong Q., Yang C., Chen L., Chen Y., Wang Q., Zhao K. y Jin W. Involvement of MyoD and PEA3 in regulation of transcription activity of MDR1 gene. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2010. 42(12): 900-907.
- Zhai, B. J., Shao, Z. Y., Zhao, C. L., Hu, K. y Wu, F. Development and characterization of multidrug resistance human hepatocarcinoma cell line in nude mice. *World J Gastroenterol.* 2006. 12(41): 6614-6619.
- Zuben ES. y Ambudkar SV. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther.* 2007. 6(1): 13-23.



## *XI.-ANEXOS*

### **ANEXO 1:** Extracción de ARNm con TRIZOL<sup>®</sup>

- Lavar con las células PBS para retirar residuos de medio de cultivo.
- Agregar directamente a la caja 250 ml de TRIZOL<sup>®</sup>, pipetear varias veces sobre toda la superficie de la caja. Colectar en tubo eppendorf.
- Agregar 200  $\mu$ l de cloroformo por cada 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup>, agitar vigorosamente con la mano por 15 segundos, centrifugar a no más de 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- Transferir fase acuosa a un tubo nuevo. Agregar 500  $\mu$ l de isopropanol por cada 1ml de TRIZOL<sup>®</sup>. Centrifugar a no más de 12000 por 10 minutos a 4°C, se observara el botón.
- Remover sobrenadante. Lavar el botón con etanol al 75%, agregar 1ml de etanol por cada 1ml de TRIZOL<sup>®</sup>, centrifugar a no más de 7500 durante 5 minutos a 4°C.
- Retirar sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente. Se recomienda evitar dejar secar el botón completamente para evitar que disminuya su solubilidad.
- Disolver el botón en agua DEPC y almacenar resultante a . 70 °C.

### Preparación de gel de agarosa.

- Pesar en la báscula el equivalente al 1% de de la capacidad de la cámara de electroforesis.
- Medir la cantidad de TBE de acuerdo a la capacidad de la cámara.
- Verter la garosa en el TBE y calentar hasta disolver la garosa.
- Esperar a que se enfríe y agregar 1.5  $\mu$ l de bromuro de etidio y mezclar
- Colocar la mezcla sobre la cámara y colocar el peine.
- Ya preparado el gel se retira el peine y se cubre con TBE hasta llenar la cámara.
- Mezclar 5  $\mu$ l de muestra y 3  $\mu$ l de colorante y colocarlo sobre los pozos.
- Correr el gel en un periodo de 30-40 minutos a 60 Volts.

ANEXO 7: Síntesis de ADN c.

- Descongelar ARN m a temperatura ambiente.
- Descongelar reactivos y colocarlos en hielo.
- Realizar la mezcla de reacción en las cantidades indicadas en la tabla 13
- Tomar 10 µl de la mezcla de reacción y mezclarlos con 10 µl de muestra
- Mezclar y colocar en el termociclador.
- Programar la PCR bajo las condiciones indicadas en la tabla 14
- Una vez terminado el programa almacenar a -20 °C.

Tabla 4: Mezcla de reactivos empleados en la RT-PCR

<b>Reactivos</b>	<b>1 X</b>	<b>15 X</b>
Agua	1.0 µl	15.0 µl
Solución amortiguadora	4.0 µl	60.0 µl
Random	2.0 µl	30.0 µl
d NTP`s	2.0 µl	30.0 µl
Inhibidor de RNAsas	0.5 µl	7.5 µl
Reverso Transcriptasa	0.5 µl	7.5 µl

Tabla 5: Ciclos del protocolo de la RT-PCR.

<b>Segmentos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Preincubación	10 minutos	25 °C
Incubación	30 minutos	55 °C
Desnaturalización	5 minutos	85 °C

#### ANEXO 8: Determinación de la expresión de MDR1 e IL-6

- Descongelar la muestra de ARNm.
- Descongelar reactivos y colocarlos en hielo.
- Realizar la mezcla de reacción con la sonda indicada para cada gen (MDR1-sonda número 18, RPLR0 sonda número 6 e IL-6 sonda sonad numero )en las cantidades indicadas en la tabla 15
- Colocar los capilares sobre el termoblock.
- Tomar 5  $\mu$ l de la reacción y colocarlos sobre el capilar.
- Agregar al capilar 5 muestra  $\mu$ l (dilución 1:5).
- Tomar los capilares y centrifugar
- Programar la PCR bajo las condiciones indicadas en la tabla 16

Tabla 6: Mezcla de reactivos empleados en la PCR . tiempo real.

<b>Reactivos</b>	<b>1 X</b>	<b>33 X</b>
Agua	2.5 $\mu$ l	82.5 $\mu$ l
Mezcla de reacción	2.0 $\mu$ l	66.0 $\mu$ l
Iniciador sentido	0.2 $\mu$ l	6.6 $\mu$ l
Iniciador antisentido	0.2 $\mu$ l	6.6 $\mu$ l
Sonda # 18	0.1 $\mu$ l	3.3 $\mu$ l
Muestra	0.1 $\mu$ l	3.3 $\mu$ l

Tabla 7: Ciclos del protocolo de la PCR en tiempo real.

	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización	1	95 °C	10 min
Amplificación	45		
Desnaturalización		95 °C	10 seg
Extensión		10 °C	1 seg
Alineación		40 °C	30 seg
Enfriamiento	1	40 °C	30 seg.

**ANEXO 3**

Tabla 8: Secuencia del gen MDR1

Iniciador	Tamaño	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Sentido	20	2105-2124	60	50	acagaaagcgaagcatggt
Antisentido	19	21-48-2166	59	53	atggtggtccgacctttc
Amplicón (62nt)					

No. De acceso NM\_000927.3 (Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

tattcagatattctccagattcctaaagattagagatcatttctcattctcctaggagtactcacttcaggaagcaaccagat  
aaaagagaggtgcaacggaagccagaacattcctcctggaaattcaacctgttcgcagtttctcgaggaatcagcatt  
cagtcaatccgggccgggagcagtcattctgtggtgaggctgattggctgggcaggaacagcgccggggcgtgggct  
gagcacagccgcttcgctctctttgccacaggaagcctgagctcattcgagtagcggctctccaagctcaaagaagc  
agaggccgctgttcgcttcttaggtcttccactaaagtcggagtatcttctccaaaattcacgtcttggtggccgtcca  
aggagcgcgaggtcggatggtatggaagggaccgcaatggaggagcaagaagaagaactttttaactga  
acaataaaagtgaaaaagataagaaggaaaagaaaccaactgtcagtgattttcaatgtttcgtattcaaattggctt  
gacaagttgtatatggtggtgggaactttggctgccatcatccatggggctggacttctctcatgatgctggtgtttggag  
aatgacagatatctttgcaaatgcaggaaatttagaagatctgatgtcaaacatcactaatagaagtatatcaatgat  
acagggttctcatgaatctggaggaagacatgaccaggtatgcctattattacagtggaattggtgctgggggtgctggtt  
gctgcttacattcaggttctattttggtgcctggcagctggaagacaaatacaciaaaattagaaaacagttttcatgctat  
aatgcgacaggagataggctggtttgatgtgcacgatgttggggagcttaacacccgacttacagatgatgtctccaag  
attaatgaaggaattggtgacaaaattggaatgttctttagcgaatggcaacattttcactgggtttatagtaggattaca  
cgtggttgaagctaaccctgtgattttggccatcagtcctgttctggactgtcagctgctgtctggcacaagatactatct  
tctttactgataaagaactcttagcgtatgcaaaagctggagcagtagctgaagaggtcttggcagcaattagaactgt  
gattgcatttgaggacaaaagaagaacttgaaaggtacaacaaaaatttagaagaagctaaaagaattgggata  
aagaagctattacagccaatatttctatagggtgctgcttctgctgatctatgcatcttatgctctggccttctggtatggga  
ccaccttggtcctcaggggaatattctattggacaagtactcactgtattctttctgtattaattggggcttttagtgggac  
aggcatctcaagcattgaagcatttgcaaatgcaagaggagcagcttatgaaatctcaagataattgataataagcc  
aagtattgacagctattcgaagagtgggcacaaccagataatattaagggaatttgaattcagaaatgttcacttc  
agttaccatctcgaaaagaagttaagatcttgaagggctgaacctgaaggtgcagagtgggcagacgggtggcct  
ggttggaaacagtggctgtgggaagagcacaacagtcagctgatgcagaggctctatgacccacagaggggat  
ggtcagtggtgatggacaggatattaggaccataaatgtaaggttctacgggaaatcattggtgtggtgagtcaggaac  
ctgtattgtttgccaccacgatagctgaaaacattcgtatggccgtgaaaatgtcaccatggatgagattgagaaaagct

gtcaaggaagccaatgcctatgactttatcatgaaactgcctcataaattgacaccctgggtggagagagagggggccc  
agttgagtgggtgggcagaagcagaggatgccattgcacgtgccctgggtcgaacccaagatcctcctgctggatg  
agggcacgtcagccttggacacagaaagcgaagcagtggttcaggtggctctggataaggccagaaaaggtcggga  
ccaccattgtgatagctcatcgtttgctacagttcgtaatgctgacgtcatcgctggtttcgatgatggagtcattgtggaga  
aaggaaatcatgatgaactcatgaaagagaaaggcatttacttcaaactgtcacaatgcagacagcaggaaatgaa  
gttgaattagaaaatgcagctgatgaatccaaaagtgaattgatgccttggaaatgtcttcaaattgattcaagatccag  
tctaataagaaaaagatcaactcgtaggagtgtccgtggatcacaagcccaagacagaaagcttagtaccaaagag  
gctctggatgaaagtatacctccagtttctttggaggattatgaagctaaatttaactgaatggccttattttgttgggtg  
atgtcctgaaacaaaacgacagaatagtaactgttttactattgtttctagcccttggaaattttctttattacattttcct  
tcagggtttcacatttggcaaagctggagagatcctcaccaagcggctccgatacatggtttccgatccatgctcagac  
aggatgtgagttggttggatgaccctaaaaacaccactggagcattgactaccaggctcgccaatgatgctgctcaagtt  
aaaggggctataggttccaggcttctgttaattaccagaatatagcaaacttgggacaggaataattatccttcatc  
tatggttggcaactaacactgttactcttagcaattgtaccatcattgcaatagcaggagttgtgaaatgaaaatgttgc  
tggacaagcactgaaagataagaaagaactagaaggttctgggaagatcgctactgaagcaatagaaaacttccga  
accgttgttcttggactcaggagcagaagttgaacatatgtatgctcagagtttgcaggtaccatacagaaactcttga  
ggaaagcacacatcttggaaattacattttccttaccaggcaatgatgtattttctatgctggatgtttccggttggagc  
ctacttgggtggcacataaactcatgagcttggaggatgttctgttagtattttcagctgttgtcttgggtccatggccgtggg  
caagtcagttcattgctcctgactatgccaaagccaaaatcagcagcccacatcatcatgatcattgaaaaacc  
ctttgattgacagctacagcacggaaggcctaattgccgaacacattggaaggaaatgtcacatttgggtgaagttgtattc  
aactatcccacccgaccggacatcccagtgctcagggactgagcctggagggtgaagaaggccagacgctggctc  
tgggtggcagcagtggtgtgggaagagcacagtggtccagctcctggagcgggttctacgacccttggcagggaaa  
gtgctgcttgatggcaaaagaaataaagcgactgaatgttcagtggtccgagcacacctgggcatcgtgtcccaggag  
cccatcctgttggactgagcattgctgagaacattgcctatggagacaacagccgggtggtgtcacaggaagagattg  
tgagggcagcaaaggaggccaacatacatgccttcatcgagtcactgcctaataaataagcactaaagtaggagac  
aaaggaactcagctctctgggtggccagaaacaacgcattgccatagctcgtgcccttgttagacagccatattttgctt  
tggatgaagccacgtcagctctggatacagaaagtgaaaaggtgtccaagaagccctggacaaagccagagaag  
gccgcacctgattgtgattgctcaccgctgtccaccatccagaatgcagacttaatagtggtgttccagaatggcaga  
gtcaaggagcatggcacgcatcagcagctgctggcacagaaaggcatctattttcaatggtcagtgctcaggctgga  
acaaagcggcagtgactctgactgtatgagatgttaaacttttaataattttagatgatgacatttcaaggttaa  
agcaaacacttacagaattatgaagaggtatctgttaacatttctcagtcaggtcagagacttctgtaatt

aaaggaacagagtgagagacatcatcaagtggagagaaatcatagtttaaactgcattataaattttataacagaatta  
 aagtagattttaaaagataaaaatgtgtaattttgtttatatttcccattggactgtaactgactgccttgctaaaagattatag  
 aagtagcaaaaagtattgaaaatgtttgcataaagtgtctataataaaaactaaactttcatgtgactggagtcattctgtcca  
 aactgcctgtgaatatacttctctcaattggaatattgtagataaacttctgctttaaaaaagtttcttaaatatacctactcat  
 tttgtgggaatggtaagcagtttaataattcctgtgtatgtctattcacattgggtcttacagaacctctggcttcattc  
 ttctggactgatcctgctgattctgcattccacat

(Fuente: [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com))

#### ANEXO 4

Tabla 9: Secuencia de IL-6

Iniciador	Tamaño	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Sentido	20	32-51	59	55	gaagctctatctgcctcca
Antisentido	18	21-48-2166	59	61	agcaggcaacaccaggag
Amplicón (103nt)					

No.- de acceso NM\_000600.1 (Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

ttctgccctcgagcccaccgggaacgaaagagaagctctatctgcctccaggagcccagctatgaactccttctcca  
 caagcgccttcggtccagttgccttctccctggggctgctcctggtggtgctgctcctccctgccccagtacccccagg  
 agaagattccaaagatgtagccgccccacacagacagccactcacctctcagaacgaattgacaaacaaattcggt  
 acatcctcgacggcatctcagccctgagaaaggagacatgtaacaagagtaacatgtgtgaaagcagcaaagagg  
 cactggcagaaaacaacctgaaccttccaaagatggctgaaaaagatggatgctccaatctggattcaatgaggag  
 acttgctggtgaaaatcatcactggcttttggagtttgaggatacctagagtacctccagaacagatttgagagtagta  
 ggaacaagccagagctgtgcagatgagtacaaaagtcctgatccagttcctgcagaaaaaggcaaagaatctagat  
 gcaataaccaccctgaccaaccacaaatgccagcctgctgacgaagctgcaggcacagaaccagtggctgag  
 gacatgacaactcatctcattctgcgcagcttaaggagttcctgcagctccagcctgagggctcttcggcaaatgtagcat  
 gggcacctcagattgtgtgtaatgggcattccttcttctggtcagaaacctgtccactgggcacagaacttatgtgtcta  
 tggagaactaaaagatgagcgttaggacactatttaatttttaatttataatatttaaatatgtgaagctgagttatta  
 tgaagtcatatttatattttaagaagtaccactgaaacattttatgtattagtttgaataataatggaaagtggctatgcg  
 tttgaatatcctttgttcagagccagatcatttctggaaagtgtaggcttacctcaataaatggctaacttatacatattta  
 aagaaatatttatattgtattataatgtataaatggttttataccaataaatggcattttaaaaaattc

(Fuente: [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com))

## ANEXO 5

Tabla 13: Secuencia de RPLR0

Iniciador	Tamaño	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Sentido	18	177-194	59	61	gatgccaggaagacag
Antisentido	21	255-275	60	43	tctgctcccacaatgaaacat
Amplicón (99nt)					

No. NM\_001002.3 (Fuente: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

gtctgacggcgatggcgcagccaatagacaggagcgctatccgcggttctgattggctactttgttcgattataaaa  
ggcacgcgcggcgagggcccttctcgcagggcgtcctcgtggaagtgacatcgtctttaaaccctgcgtggcaa  
tcctgacgcaccgccgtgatgccaggaagacagggcgacctggaagtccaactacttccctaagatcatccaac  
tattggatgattatccgaaatgttcattgtgggagcagacaatgtgggctccaagcagatgcagcagatccgcatgtcc  
cttcgcgggaaggctgtggtgctgatgggcaagaacacatgatgcgcaaggccatccgagggcacctggaaaac  
aaccagctctggagaaactgctgcctcatatccgggggaatgtgggctttgtgttcaccaaggaggacctactgag  
atcagggacatgttgctggccaataagggtgccagctgctgcccgtgctggtgccattgccccatgtgaagtcaactgtcc  
agcccagaacactggtctcgggcccgagaagacctctttccaggctttaggatcaccactaaaatctccaggggc  
accattgaaatcctgagtgatgagcagctgatcaagactggagacaaagtgggagccagcgaagccacgctgctga  
acatgctcaacatctccccttctccttgggctggtcatccagcaggtgttcgacaatggcagcatctacaaccctgaag  
tgcttgatcacagaggaaactctgcattctcgttctggagggtgccgcaatgtgccagtgtctgtctgcagattgg  
ctaccaactgttgcacgtacccattctatcatcaacgggtacaaacgagtcctggccttgtctgtggagacggatta  
caccttcccactgtgaaaaggtaaggccttcttggctgatccatctgccttggctgctgcccctgtggctgctgcca  
ccacagctgctcctgctgctgctgcagccccagctaaggtgaagccaaggaagagtcggaggagtcggacgagg  
atatgggattgtgctcttgaactaaccaaaaagcaaccaacttagccagttttattgcaaaaacaaggaaataaag  
gcttactctttaaagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

(Fuente: [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com))