



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**RESTAURACIÓN DE LA QUIMIOSENSIBILIDAD EN CÉLULAS DE CÁNCER CON
FENOTIPO MDR, MEDIADA POR MIR-223**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ERIKA SICAHUI LÓPEZ CASTILLEJOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZA VALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICAS, UNAM
DR. LEON PATRICIO MARTINEZ CASTILLA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2015.



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.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos otorgados por CONACYT durante mis estudios de maestría.

A los miembros del Comité Tutor, que durante mi proyecto aportaron buenos comentarios y críticas a mi trabajo.

Dr. Guillermo Aquino Jarquin.

Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

Dr. León Patricio Martínez Castilla.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres Olga y Heriberto por las grandes enseñanzas y amor que me han dado durante todos estos años, gracias a ustedes he podido concluir todas mis metas, son un gran ejemplo para mí, los quiero mucho.

A mi abuelita Olga porque llevamos muchos años cuidándonos, haciéndonos compañía y hemos pasado buenos momentos, te quiero abue.

A mi hermana Karla por ser buena compañía y hacerme reír en todo momento. También a mi tía Nery por siempre estar pendiente y platicar conmigo sobre sus experiencias muy enriquecedoras.

A mis tías Leti y Eli que siempre tienen una sonrisa para mí y dulces palabras para animarme en todo momento, siempre las llevo en mi corazón.

A mis tíos Luis Felipe, Cuauhtémoc, Luis, Gilberto, Alejandro, Cinthya, Irma y Laura que me han apoyado en cualquier circunstancia, dándome consejos de manera desinteresada.

A mis primas Cinthya y Biaani, que siempre escuchan atentamente todas mis anécdotas y problemas, además de siempre pasar un momento agradable con sus compañía, las quiero.

Y por último pero no menos importante a Alejandro por siempre estar a mi lado, escucharme, acompañarme y apoyarme en todos mis pasos, además de compartir grandes experiencias a mi lado.

1. ÍNDICE GENERAL.

	Página
1. Índice general.	i
2. Índice de figuras.	ii
3. Índice de tablas.	iii
4. Índice de abreviaturas.	iv
5. Resumen.	1
6. Abstract	2
7. Introducción.	3
7.1. Pequeños RNAs horquillados (microRNA).	3
7.1.1. Biogénesis de los microRNAs.	4
7.1.2. Mecanismo de acción de los miRNAs.	4
7.1.3. Identificación del blanco de los miRNAs.	8
7.1.4. Papel de los miRNAs en la homeostasis fisiológica.	10
7.2. Proteínas relacionadas con la resistencia a múltiples drogas. (Proteínas-MDR).	11
7.2.1. La glicoproteína P estructura y función.	12
7.2.2. Regulación de Pgp-170 a través de miRNAs.	14
8. Antecedentes.	16
9. Planteamiento del problema.	18
10. Hipótesis.	18
11. Objetivo general.	18
11.1. Objetivos particulares.	18
12. Metodología.	19
13. Estrategia experimental.	20
13.1. Nivel de expresión de miR-223 por PCR en tiempo real.	20
13.2. Nivel de expresión de <i>MDR1</i> y Pgp-170.	21
13.3. Construcción de antagomiros para miR-223.	22
13.4. Transducción de células CCRF mediante partículas virales.	23
13.5. Modulación del nivel de expresión de Pgp-170 mediante miR-223.	25
13.6. Ensayos de funcionalidad de la bomba Pgp-170.	25
13.6.1. Evaluación del eflujo de rodamina 123.	25
14. Resultados.	26
14.1. Expresión endógena de miR-223 en células CCRF-CEM y CEM7C2.	26
14.2. Nivel endógeno de <i>MDR1</i> y Pgp-170.	27
14.3. Generación de antagomiros para miR-223.	31
14.4. Producción de viriones para la transducción de las células CCRF-CEM.	33
14.5. MiR-223 disminuye los niveles de la proteína gp-170.	37
14.6. Evaluación de la funcionalidad de Pgp-170 mediante ensayos de eflujo de rodamina 123 con y sin la expresión por miR-223.	38
15. Discusión.	45
16. Conclusiones.	47
17. Perspectivas.	47
18. Anexos	48
19. Literatura citada.	49

2. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Biogénesis de los miRNAs.	5
2. Mecanismo de acción de los miRNAs.	6
3. Represión de la traducción en las células animales mediada por miRNAs.	7
4. Representación esquemática de la estrategia de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, mediante el uso de oligos RT de tallo-burbuja y sonda Taqman (Life Technologies Corporation, 2010), para la detección de miRNAs.	10
5. Modelo humano de la glicoproteína P.	13
6. Modelos de expulsión de los sustratos de Pgp-170. A) Modelo de aspiradora y flipasa.	14
7. Análisis <i>in-silico</i> del UTR-3' del mRNA de Pgp-170, en donde se muestra un posible sitio de unión a miR-223. (www.microRNA.org).	15
8. MiR-223 regula de manera postranscripcional a Pgp-170.	16
9. Metodología experimental.	19
10. Prueba Gostix.	24
11. Gráfica de amplificación de miR-223 y U6, mediante RT-PCR en tiempo real, a partir de RNA total obtenido de las células CCRF y CEM/C2.	26
12. Expresión de miR-223 en células CCRF y CEM/C2 .	27
13. Gráfica de amplificación de MDR1 y β -Actina como control por RT-PCR en tiempo real, a partir de RNA total de las células CCRF y CEM/C2.	28
14. Expresión de MDR1 en células CCRF y CEM/C2.	28
15. Expresión de Pgp-170 en células AD-293.	29
16. Expresión de Pgp-170 en células CCRF.	30
17. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión EcoRI/BamHI del vector pLVX-shRNA2 (Clontech).	31
18. Electroferograma de la secuencia del antagomiro sencillo de miR-223.	32
19. Electroferograma de la secuencia del antagomiro en tandém de miR-223.	33
20. Eficiencia de transfección del vector pLVX-miR-138, en las células HEK293T.	34
21. Eficiencia de transfección del vector pLVX-scramble en las células HEK293T.	34
22. Prueba GoStix en los sobrenadantes pLVX-scramble y pLVX-miR-138 para observar la producción de unidades infecciosas por ml (partículas virales).	35
23. Transfección del vector pLVX-miR-138 en las células HEK293T.	36

24. Prueba GoStix del sobrenadante de pLVX-miR-138 para estimar la producción de unidades infecciosas por ml (partículas virales).	36
25. Células AD-293 y CCRF transducidas con los lentivirus que expresan miR-138.	37
26. Modulación de la expresión de Pgp-170 en células AD-293 mediante miR-223.	38
27. Viabilidad de las células AD-293, tratadas a diferentes concentraciones con Rodamina 123 (Rod).	39
28. Viabilidad y expulsión de rodamina 123 (Rod) en células AD-293.	40
29. Viabilidad de las células AD-293 tratadas a diferentes dosis de Ciclosporina A (CsA).	41
30. Efecto de la CsA en la inhibición de la bomba gp-170.	42
31. Inhibición de la bomba gp-170 mediante Verapamil (Ver).	43
32. Efecto de miR-223 sobre la bomba gp-170 en células AD-293.	44
33. Espectro de emisión de GFP y Rodamina 123.	48
34. Espectro de emisión de GFP y posibles sustratos de Pgp-170 para el ensayo de eflujo.	48

3. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Bases bioinformáticas de miRNAs y predicción de sus blancos.	9
2. Sustratos de Pgp-170.	12
3. Oligonucleótidos para RT-PCR en tiempo real.	21
4. Secuencia de los antagómiros de miR-223.	23
5. Mezcla de empaquetamiento viral.	24

4. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ABC	Casete de unión al ATP
ABCB1	Casete de unión al ATP, subfamilia B, miembro 1.
ATP	Adenosín Trifosfato
CAP	Caperuza
CDNA	DNA complementario
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DsODN	Oligonucleótidos de doble cadena
FT	Factores de Transcripción
H	Hora
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MDR	Multirresistencia a Drogas
MDR1	Multirresistencia a Drogas Familia 1
MFE	Energía libre mínima
Min	Minuto
MiRISC	MicroRNA asociados al complejo de silenciamiento inducido por RNA
MiRNA	Micro RNA
MRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MUT	Mutado
NBD	Dominio de Unión a Nucleótidos
Nt	Nucleótido
ORF	Marco de lectura abierto del inglés Open Reading frame
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa del inglés Polymerase Chain Reaction
Pgp-170	Glicoproteína P-170
Pre-miRNA	Micro RNA precursor
Pri-miRNA	Micro RNA primario
QPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa del inglés Quantitative Polymerase Chain Reaction
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA del inglés
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción inversa del inglés
SC	Complementariedad de la secuencia
S	Segundo
SiRNA	RNA pequeño interferente del inglés small interfering RNA
SLC	Acarreador de soluto del inglés solute carrier
SM	Secuencia semilla
U	Unidad
UTR	Región no traducible del inglés untranslated region
WT	Silvestre del inglés wild type
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromoles

5. RESUMEN

La sobreproducción de la glicoproteína Pgp-170 codificada por el gen de multiresistencia a drogas (*MDR1*), provoca la secreción de los fármacos que ingresan a la célula, lo que denota un obstáculo en la eficacia terapéutica. Se ha encontrado evidencia de que a nivel postranscripcional Pgp-170 es regulada por pequeños RNAs no codificantes de cadena sencilla denominados microRNAs (miRNAs), los cuales contribuyen a la degradación o inhibición a su mRNA blanco. Previamente, mediante ensayos de luciferasa se comprobó que existe una interacción directa entre miR-223 y *MDR1*. Por lo que es necesario conocer, mediante análisis funcionales, si miR-223 contribuye a que se restablezca la quimiosensibilidad en células con fenotipo MDR.

Inicialmente, se evaluó la expresión de miR-223 en células CCRF, células de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) pediátrica mediante RT-PCR tiempo real encontrando que existe un nivel endógeno de este miRNA, también se evaluó el nivel de Pgp-170 mediante citometría de flujo observando una expresión abundante en células CCRF. En el caso de las células LLA pediátricas que poseen una expresión endógena de miR-223, se construyó un lentivirus que expresa un antagómiro para la inhibición específica de miR-223, sin embargo la baja producción de partículas virales no permitió una transducción viral exitosa, por lo tanto los experimentos se continuaron en las células AD-293. Las células AD-293 no expresan miR-223, por lo que fueron transfectadas con un vector que expresa miR-223 (pLVX-miR-223), 24 h postransfección se observó una disminución significativa en la expresión de Pgp-170.

Posteriormente se evaluó la funcionalidad de Pgp-170 por citometría de flujo, a través del eflujo de rodamina 123 en las células con y sin expresión de miR-223. De manera interesante, no se observó una disminución significativa en el eflujo de rodamina 123 mediada por miR-223. Esto podría ser debido a la cantidad limitante del mimic de miR-223 (10 nM) que se transfectó o por el corto periodo en que se evaluó el efecto. Aunque miR-223 disminuye significativamente la expresión de Pgp-170, es necesario confirmar que un mecanismo de apoptosis puede ser inducido eficazmente por miR-223 después del tratamiento con el agente quimioterapéutico. Esto corroborará que la inhibición de Pgp-170 por miR-223 induce la acumulación del fármaco en las células para la restauración de la quimiosensibilidad.

6. ABSTRACT

Overproduction of Pgp-170 glycoprotein encoded by the Multidrug Resistance Gene (*MDR1*), causes the excretion of the drugs that enter the cell, denoting an obstacle in the therapeutic efficacy. Researchers had found that post-transcriptional level of Pgp-170 is regulated by non-coding single stranded small RNAs called microRNAs (miRNAs), which degrade or inhibit its mRNA target. Previous evidence using luciferase assays, it was found that exist a direct interaction between miR-223 and *MDR1*. So it is necessary to know if miR-223 might restore chemosensitivity in cells with *MDR* phenotype.

First, the expression of miR-223 in CCRF cells, pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) cells was assessed by real time RT-PCR finding that there is an endogenous level of this miRNA. The level of Pgp-170 was also evaluated by flow cytometry observing high expression in CCRF cells. In the case of pediatric ALL cells with endogenous expression of miR-223, a lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miR-223 was constructed to modulate of miRNA function, however, low particle production didn't allow a successful viral transduction experiments. Thus, we continued the assays in the AD-293 cells. AD-293 cells do not express miR-223, therefore they were transfected with a miR-223-expression vector (pLVX-miR-223) and 24 hrs post-transfection a significant Pgp-170-downregulation was observed.

Subsequently we evaluated the functionality of the gp-170 protein by flow cytometry, through efflux of rhodamine 123 in cells with and without expression of miR-223. Interestingly, a significant decrease in the efflux of the dye Rhodamine 123 mediated by miR-223 was not observed. This could be due to a limiting amount of mimic of miR-223 (10 nM) that was transfected or by the short period of time that the effect was evaluated. Although miR-223 significantly downregulated the expression of Pgp-170, it is necessary to confirm that an apoptotic mechanisms can be effectively induced by miR-223 after treatment with chemotherapeutic agent. This will confirm that the inhibition of Pgp-170 by miR-223 induces accumulation of the drug into cells to restoring chemosensitivity.

7. INTRODUCCIÓN

7.1. Pequeños RNA horquillados (microRNAs).

Los microRNAs son una clase de pequeños RNA no codificantes de cadena sencilla de 21 a 23 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica a través de la unión al UTR-3' de los mRNAs, resultando en la degradación o inhibición de la traducción de su blanco (mRNA). Estos RNAs juegan un papel importante en la regulación de procesos biológicos como: el desarrollo, diferenciación, proliferación celular, mecanismos de respuesta al estrés o en distintos procesos patológicos incluido el cáncer^{1,2}.

Más del 60% de los genes en humanos que codifican para proteínas contienen al menos un sitio conservado de unión a miRNAs, además existen numerosos sitios no conservados, por lo que la mayoría de los genes que codifican proteínas pueden estar bajo el control de miRNAs. Por lo tanto, no es sorprendente que la biogénesis, función de miRNAs y su desregulación se asocien con enfermedades humanas, incluyendo cáncer y desordenes del neurodesarrollo³.

El primer microRNA (miRNA) fue descubierto en 1993; Víctor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaun, encontraron que *lin-4*, un gen que actuaba en el control del desarrollo de *Caenorhabditis elegans*, no codificaba para proteínas, en cambio producía RNAs pequeños, de 22 nt de longitud. Víctor Ambros y Gary Ruvkun observaron que estos RNAs mostraban porciones antisentido complementarias a múltiples sitios de la región UTR-3' del gen *lin-14*, además una disminución en la cantidad de proteína sin que hubiera una reducción de los niveles de mRNA. El pequeño RNA *lin-4*, es ahora reconocido como el miembro fundador de una clase muy abundante de pequeños RNAs reguladores. Desde el descubrimiento de *lin-4* en *C. elegans*, se han ido descubriendo miRNAs en otras especies y ahora sabemos que muchos organismos multicelulares expresan cientos de miRNAs. El segundo miRNA identificado fue *let-7*, proveniente de otro gen de *C. elegans*, el cual actuaba promoviendo el desarrollo de la larva tardía hacia la forma adulta. En 1999, Baulcombe y colaboradores descubrieron miRNAs que también participan en el silenciamiento de genes vegetales. Pero hasta el año 2001 fue introducido el término miRNA formalmente^{4,5}. El descubrimiento de miRNAs y sus mRNAs blanco ha puesto en evidencia nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica⁶.

7.1.1. Biogénesis de los microRNAs.

Los genes que codifican para los miRNAs se localizan en regiones intergénicas e intragénicas del genoma, así como también en regiones intrónicas de genes que pueden codificar para proteínas. En el caso de los microRNAs intragénicos, la expresión de éstos, puede ir de la mano con la regulación transcripcional de su gen hospedero y de esta manera se explicaría la especificidad tisular. Los miRNAs intergénicos, su expresión está regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores, como sus propios promotores. También se ha observado que los miRNAs pueden ser derivados de secuencias repetidas de DNA y de elementos transponibles^{7,8}.

Los microRNAs se generan en el núcleo de la célula, transcritos por la RNA polimerasa II, que produce una molécula larga de RNA, con una estructura en forma de tallo-burbuja. Esta estructura se denomina miRNA primario (pri-miRNA), la cual es reconocida por una endonucleasa RNasa III, llamada Drosha, que corta solo RNAs de doble cadena y que se asocia a la proteína DGCR8 (por sus siglas en inglés DiGeorge syndrome critical region gene 8) en mamíferos o Pasha en *Drosophila* y *C. elegans*. El corte realizado por la enzima Drosha se da en el extremo cercano a la base de la horquilla del pri-miRNA y genera una estructura conocida como miRNA precursor (pre-miRNA), que tiene un tamaño de aproximadamente 60 a 70 nucleótidos de longitud. Posteriormente, los miRNAs precursores son exportados al citoplasma celular de forma activa, a través de Exportina-5, un complejo proteico dependiente de RAN-GTP, para su proceso de maduración. RAN es un cofactor que se une a GTP durante la exportación nuclear de RNA. En el citoplasma, la molécula GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador. Posteriormente, ocurre un segundo corte por otra endonucleasa tipo III de reconocimiento de RNAs de doble cadena llamada Dicer, asociada a las proteínas TRBP (por sus siglas en inglés HIV-1 TAR RNA binding protein) y PACT (PKR activating protein) en mamíferos, dando lugar a una estructura de doble cadena, de 21 a 23 nucleótidos. Sin embargo, estas dobles cadenas tienen que separarse, pues solo una de las dos será incorporada a una maquinaria enzimática denominada "Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA" (RISC, por sus siglas en inglés), para dirigir el reconocimiento y acoplamiento de los miRNAs con los mRNAs blanco que se desean desactivar. La hebra que se une al complejo RISC se convierte en el miRNA maduro, también denominada hebra guía, mientras que la otra hebra complementaria, denominada pasajera, es degradada. Una vez que se lleva a cabo este reconocimiento del miRNA con su blanco, éste es cortado por la enzima Argonata 2 que se encuentra asociada a RISC. Después del corte, el miRNA se mantiene intacto y puede guiar el reconocimiento y degradación de mensajeros adicionales, lo que hace altamente eficiente el silenciamiento génico mediado por estos pequeños RNAs (figura 1)^{1,7}.

7.1.2. Mecanismo de acción de los miRNAs

Los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA blanco o mediante la represión traduccional. Esto dependerá del grado de complementariedad del miRNA con su blanco. Si la complementariedad es perfecta o complementariedad canónica (Watson/Crick) se producirá la degradación del mRNA, mientras que si la complementariedad es parcial se producirá una inhibición de la traducción⁶.

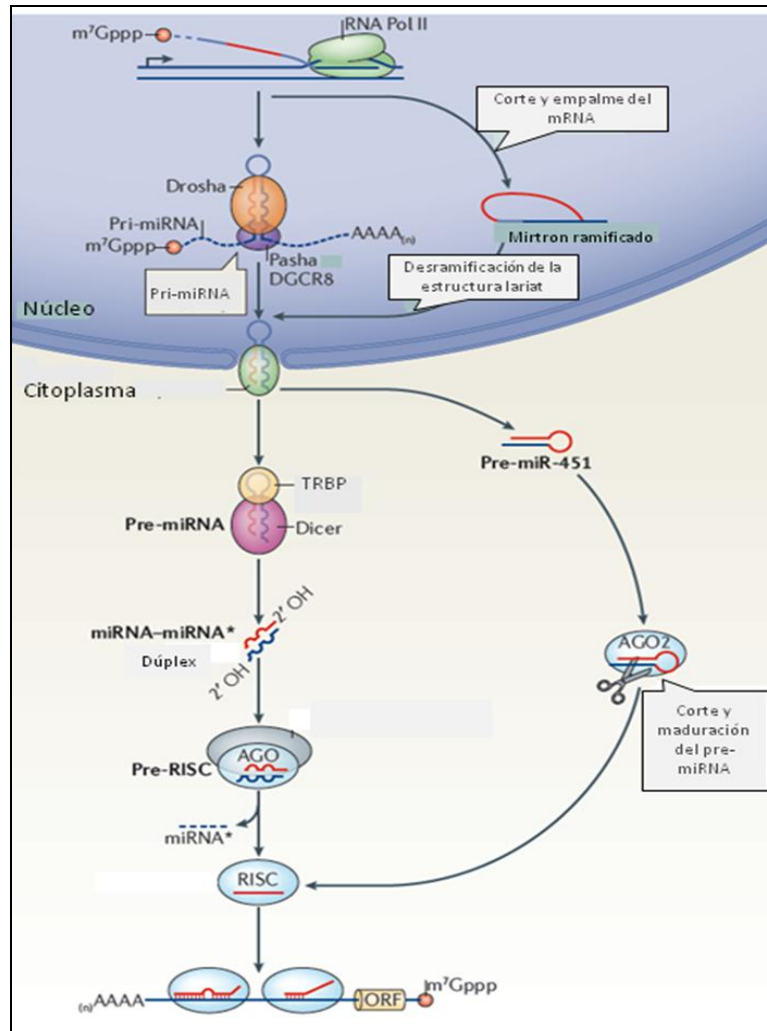


Figura 1. Biogénesis de los miRNAs. Los microRNAs se generan en el núcleo de la célula por la RNA polimerasa II, que produce una molécula larga de RNA, con una estructura en forma de tallo-burbuja. Esta estructura se denomina miRNA primario (pri-miRNA), la cual es por Droscha asociada a la proteína DGCR8 o Pasha. Droscha realiza un corte en el extremo cercano a la base de la horquilla del pri-miRNA y genera una estructura conocida como miRNA precursor (pre-miRNA). Posteriormente, los miRNAs precursores son exportados al citoplasma celular, a través de Exportina-5 y ocurre un segundo corte por la endonucleasa Dicer, asociada a las proteínas TRBP y PACT, dando lugar a una estructura de doble cadena, de 21 a 23 nucleótidos. Las dobles cadenas se separan, una de ellas se une al complejo RISC para convertirse en un miRNA maduro para dirigir el reconocimiento y acoplamiento de los miRNAs sus mRNAs blanco. Una vez que se lleva a cabo este reconocimiento del miRNA con su blanco, éste es cortado por la enzima Argonata 2 que se encuentra asociada a RISC. (Modificada de la referencia 9).

Los 7 nucleótidos de la región semilla, que comienza en el segundo nucleótido del extremo 5' terminal del miRNA, son necesarios para la interacción miRNA-mRNA. La interacción miRNA-mRNA se produce predominantemente en la región UTR-3' del mRNA blanco, situado en 3' río abajo del marco de lectura abierto (ORF) (figura 2)⁶. Cuando el apareamiento de

bases es perfecto, entre el miRNA y el mRNA, principalmente en las células vegetales, existe una escisión endonucleolítica mediada por argonata y por lo tanto la degradación del transcrito. Además para que haya una escisión específica del mRNA por argonata es necesaria la complementariedad canónica de los nucleótidos 10 y 11 en relación con el extremo 5' del miRNA. En animales a menudo existen desajustes centrales en la secuencia que bloquean la actividad de la maquinaria para cortar^{10,11}. De acuerdo a los estudios realizados con siRNAs, se cree que serían necesarios al menos 11 pares de bases (pb) para una elevada afinidad en el reconocimiento del mRNA diana y la unión a RISC. Sin embargo, Doench y Sharp reportaron que el potencial de los miRNAs para suprimir la traducción dependía enormemente de la energía libre de unión entre los primeros 8 nt del extremo 5' del miRNA y del mRNA blanco¹².

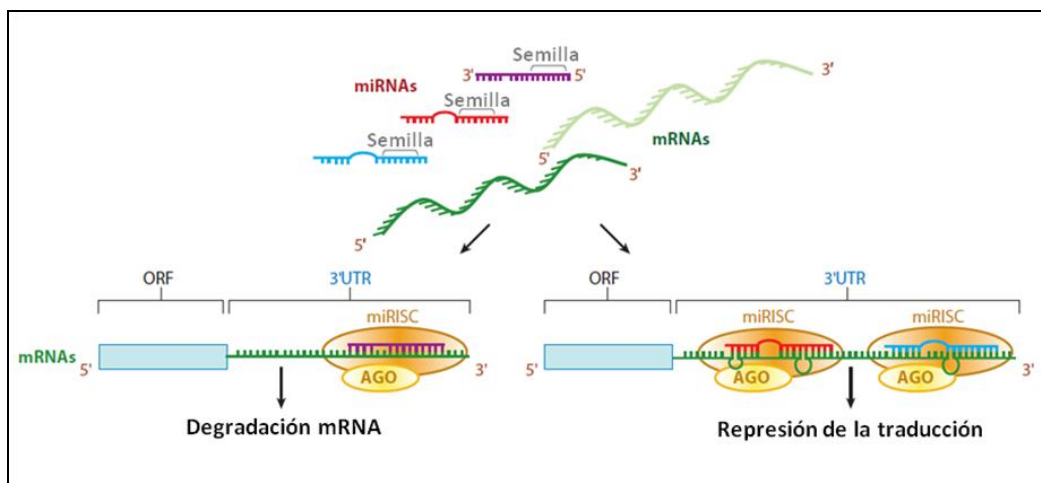


Figura 2. Mecanismo de acción de los miRNAs. La regulación de la expresión génica por miRNAs es a través de dos mecanismos principales: la degradación del mRNA blanco o mediante la represión traduccional. Esto se debe al grado de complementariedad del miRNA con su blanco. Si la existe una complementariedad canónica (Watson/Crick) se producirá la degradación del mRNA, mientras que si la complementariedad es parcial debido a protuberancias en el mRNA o miRNA se producirá una inhibición de la traducción. (Modificada de la referencia 6).

En represión traduccional, los microRNAs asociados a RISC (miRISC) pueden reconocer uniones imperfecta con solo 7-9 nt entre el miRNA/mRNA, provocando una unión de baja afinidad. Estas uniones imperfectas o no canónicas son debidas a protuberancias (loops) en el mRNA y/o en el miRNA a lo largo de la secuencia del dúplex miRNA-mRNA, para compensar la baja afinidad entre el miRISC y mRNA múltiples copias de miRISC podrían unirse al blanco¹³.

Cuando hay represión de la traducción, Argonata recluta proteínas de la familia GW182 que interactúan a través de su dominio N-terminal rico en glicina y triptófano (GW) con la endonucleasa, y su dominio C-terminal interactúa con proteínas citoplásmicas que se unen a secuencias de poli A (PABPC) y deadenilasas (Ccr4-NOT), que proporciona el vínculo de

reconocimiento del miRNA-diana por argonauta, que favorece a la represión de la traducción y posteriormente la degradación del mRNA¹⁴.

En las células animales, el miRNA puede suprimir la traducción de proteínas por los efectos directos e indirectos (figura 3). Los efectos directos se ejercen en las diversas fases de la traducción de proteínas, incluyendo la represión en la iniciación de la traducción, o al evitar el ensamblaje del ribosoma para la iniciación, en la represión en pasos post-iniciación, y la inhibición de la elongación o terminación. La represión traduccional indirecta mediada por los miRNAs, se produce al nivel de mRNA y es causado por la desestabilización y la posterior degradación, así como la compartimentalización y el secuestro de los mRNA blanco. En este modo de acción, los miRNAs desestabilizan su blanco principalmente a través de deadenilación. La compartimentalización y el secuestro se llevan a cabo en regiones del citoplasma de células eucariotas conocidas como cuerpos de procesamiento (cuerpos P), donde los mRNAs son silenciados⁶.

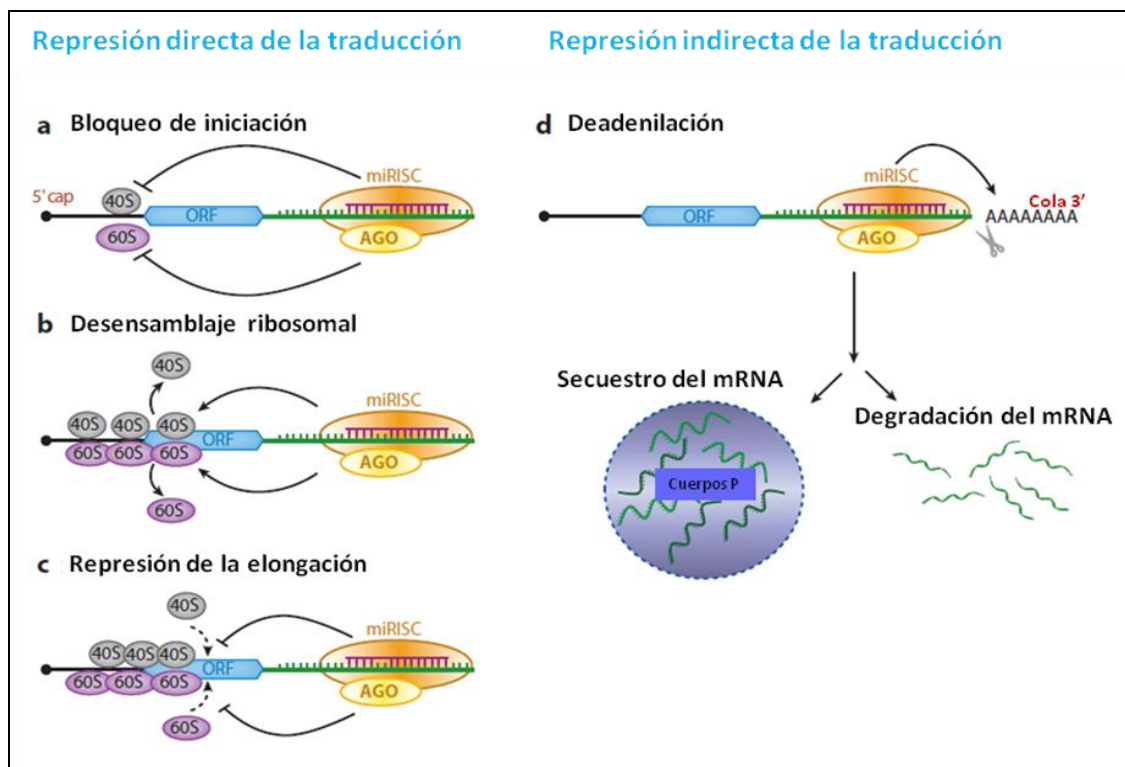


Figura 3. Represión de la traducción en las células animales mediada por miRNAs. La interacción miRISC-mRNA puede dar lugar a diversos modos de represión de la traducción. (a) El bloqueo de la iniciación: el reclutamiento de la subunidad 40S y/o 60S de los ribosomas cerca de la cap 5' de mRNA se inhibe. (b) Desensamblaje ribosomal: Los ribosomas 40S/60S se disocian del mRNA. (c) Represión del alargamiento: Evita que los ribosomas 40S/60S formen parte en el proceso de elongación. (d) La represión indirecta de traducción por miRISC se produce a través de deadenilación, cuando la cola de poli A 3' del mRNA es eliminada, dando lugar al aumento de la degradación del mRNA. Alternativamente, el mRNA desestabilizado resultante de deadenilación se va a los cuerpos P y por lo tanto es secuestrado por la maquinaria de degradación traduccional. (Modificada de la referencia 6).

En los últimos años se ha demostrado que los miRNAs son capaces no solo de unirse a la secuencia UTR-3' del mRNA sino también a la secuencia UTR-5' por ejemplo miR-103a-3p se une al UTR-5' del receptor acoplado a la proteína G, clase C, grupo 5, miembro A (GPC5A), también se puede unir a promotores como miR-324-3p que induce el promotor de RelA, y a secuencia codificante (CDS) del transcrito como let-7 se une a la secuencia codificante de Dicer^{50,51,52}.

7.1.3. Identificación del blanco de los miRNAs.

Cada miRNA puede tener muchos mRNAs blanco y cada mRNA puede estar regulado por más de un miRNA. Debido a que la identificación experimental de blancos de los miRNAs es difícil, se han diseñado programas bioinformáticos para la predicción de estos posibles sitios. La mayoría de los algoritmos consideran los siguientes parámetros: complementariedad de secuencia miRNA-mRNA, termodinámica del híbrido miRNA-mRNA, conservación de secuencias blanco entre las especies, estructura secundaria del mRNA y los cambios después de la formación del híbrido miRNA-mRNA, entre otros. Las predicciones obtenidas mediante el empleo de estos algoritmos bioinformáticos, han sido validadas experimentalmente, apoyando la predicción *in silico* (tabla 1). Así, software y algoritmos basados en enfoques *in silico*, son necesarios para ayudar a determinar los loci genómicos, funciones y blancos de los miRNAs. Los rápidos avances en la biología de los miRNA, incluyendo funciones de estos, han dado la motivación para introducir este campo fronterizo a la disciplina de bioingeniería.

Los métodos actuales para la detección y cuantificación de miRNAs son Northern blot, análisis de microarreglos, qPCR, entre otros. A pesar de que estos métodos podrían mejorar el rendimiento de los perfiles de expresión génica de los miRNA, algunos de estos son relativamente limitados en términos de sensibilidad y especificidad. La baja sensibilidad se convierte en un problema para la cuantificación de los miRNA, ya que es difícil amplificar estas secuencias tan cortas de RNA. Por otra parte, la baja especificidad de los métodos de detección puede dar lugar a falsos positivos¹⁵.

La PCR en tiempo real es el estándar de oro para la cuantificación de la expresión génica. Es un método de detección preciso y sensible para la cuantificación de miRNAs y otros RNAs pequeños. Este método expande la tecnología de PCR, para la detección de los cambios en la expresión de macromoléculas (por ejemplo, mRNA) a micromoléculas (por ejemplo miRNAs)¹⁵.

Tabla 1. Bases bioinformáticas de miRNAs y predicción de sus blancos.

Base de datos de miRNAs o predicción de blancos de miRNAs	Dirección electrónica	Abordaje
MiRBase	http://www.mirbase.org	Colección completa de miRNAs conocidos para todas las especies.
ASRP	http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/	Colección de miRNAs conocidos en plantas.
miRGen	http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html	Identifica interacciones de miRNAs y sus blancos en animales con el uso de múltiples programas de predicción.
CoGemiR	http://cogemir.tigem.it/	Genómica comparativa de miRNAs.
Base de datos de predicción de blancos de miRNAs	Dirección electrónica	Abordaje
TargetScan	http://www.targetscan.org	Secuencia semilla (SM), la complementariedad de secuencia (SC), y un mínimo de energía libre (MFE) del miRNA /dúplex blanco, las preferencias de la secuencia de sitios diana
MiRanda	http://www.microrna.org	SM, SC, and MFE
PicTar	http://www.pictar.org/	Identifica SM, SC, MFE e interacciones miRNA.
mirWIP	http://mirtargets.org/	Considera SM, SC, MFE, la estadística de las interacciones entre los miRNA y su diana.

Ha sido un reto para los científicos diseñar un ensayo convencional de PCR para miRNAs con un promedio de 22 nt de longitud. En la actualidad, el método estándar que cuantifica específicamente miRNAs está basado en un oligonucleótido tallo-burbuja RT (del inglés stem-loop RT primer). La reacción de RT-PCR en tiempo real, incluye dos pasos: reacción de retro-transcripción y PCR en tiempo real. 1) En primer lugar, la formación de cDNA a partir de oligonucleótido tallo-burbuja RT, que hibridan en la secuencia 3' de la molécula miRNA y se transcribe de forma inversa. 2) Posteriormente, el producto RT se acopla a la reacción en cadena de la polimerasa hibridándose al oligonucleótido sentido y antisentido, para el alargamiento producido por el despliegue del oligonucleótido tallo-burbuja RT, en donde la formación de dobles cadenas se cuantifica usando una sonda TaqMan convencional, acoplada a un fluoróforo (figura 4)¹⁵.

Los ensayos de RT-PCR en tiempo real con sondas TaqMan, para miRNAs pueden detectar tan bajas concentraciones como diez copias de transcripción en una muestra; incluso pequeños cambios pueden ser detectados en la expresión. Las sondas son más pequeñas que las tradicionales doblemente marcadas, lo que permite llegar eficazmente a las secuencias difíciles y aumentar la especificidad. Con las ventajas de esta técnica, la capacidad de perfilar

eficazmente a los miRNAs aumenta, proporcionando una solución práctica para su detección. (Life technologies corporation, 2010).

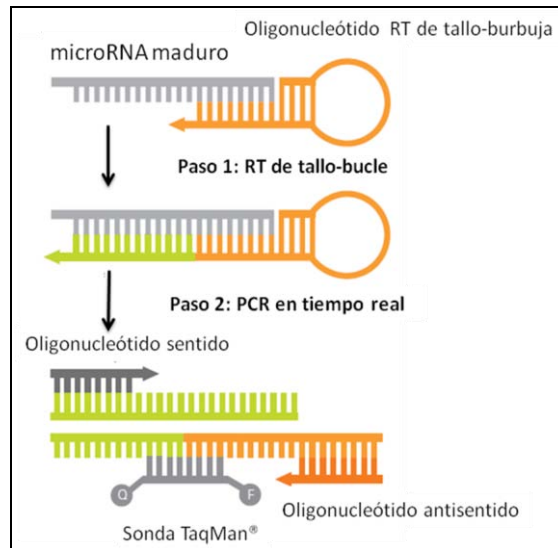


Figura 4. Representación esquemática de la estrategia de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, mediante el uso de oligonucleótidos RT de tallo-burbuja y sonda Taqman (Life Technologies Corporation, 2010), para la detección de miRNAs. Inicialmente los oligonucleótidos RT de tallo burbuja se unen a la secuencia madura del miRNA de interés llevándose a cabo una retrotranscripción y posteriormente con oligonucleótidos específicos del miRNA (sentido y antisentido) se realiza la PCR en tiempo real.

7.1.4. Papel de los miRNAs en la homeostasis fisiológica.

Los miRNAs pueden jugar un papel clave en diversos procesos biológicos, incluyendo: proliferación celular, apoptosis, multiresistencia a drogas (MDR) y de manera importante en carcinogénesis. Lo anterior les confiere un papel importante en la homeostasis celular y su papel en las alteraciones fisiopatológicas^{16,17}.

Se ha demostrado que la participación de los miRNAs en apoptosis, proliferación, supervivencia y metástasis, que conlleva al desarrollo del cáncer. La evidencia experimental indica que el uso de miRNAs puede representar una poderosa estrategia terapéutica, para interferir con las principales vías moleculares involucradas en cáncer, ya sea como oncogenes o genes supresores de tumores. Aunado a la creciente comprensión de esta regulación, los miRNAs podrían ser útiles herramientas moleculares para futuras aplicaciones clínicas⁷.

7.2. Proteínas Relacionadas con la Resistencia a Múltiples Drogas (Proteínas-MDR).

La práctica clínica diaria pone en evidencia que la mayoría de los tumores sólidos, de forma innata o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples fármacos quimioterapéuticos, con estructura y mecanismos de acción muy diferentes. Este fenómeno se ha descrito experimentalmente y recibe el nombre de resistencia a múltiples drogas o MDR (del inglés "Multidrug Resistance"). En su descripción inicial, este fenómeno se relacionó con una proteína transportadora de membrana celular llamada Pgp, pero posteriormente se descubrieron otros mecanismos causantes del fenotipo celular multirresistente, como los ligados a otras proteínas transportadoras, alteraciones de enzimas como las topoisomerasas, o sistemas detoxificantes como el del glutatión (GSH)¹⁸.

La historia de las proteínas causantes de resistencia a múltiples drogas o proteínas-MDR, se inicia en 1973, con el descubrimiento por Keld Dano, de la expulsión activa de daunomicina en células tumorales resistentes. Estas células habían sido expuestas únicamente a esta droga, pero presentaban resistencia cruzada con la doxorubicina y los alcaloides de la vinca. Estudios posteriores describieron el fenotipo celular resistente a múltiples drogas o fenotipo MDR, que consistía en que células seleccionadas para resistencia mediante la exposición a un único agente antineoplásico, desarrollaban resistencia a una amplia variedad de compuestos estructuralmente diferentes. En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína en la membrana plasmática de células multi-resistentes, que por sus características, parecía una buena candidata para ser una bomba de expulsión. Pero fue en 1983, cuando Víctor Ling y otros investigadores, dieron a conocer que el aumento de expresión de esa proteína llamada glucoproteína P (Pgp; del inglés "P-glycoprotein"), estaba implicada en la resistencia a múltiples drogas en líneas celulares de mamíferos¹⁹⁻²¹.

Estas proteínas se encuentran presentes en numerosos tejidos normales del organismo humano y en los tumores que de ellos se derivan. El hecho de que muchos de estos tejidos tengan funciones secretoras-excretoras (riñón, hígado, epitelio digestivo y respiratorio), hace pensar que las proteínas-MDR desempeñen funciones fisiológicas de protección ante toxinas exógenas²².

Las drogas afectadas por las proteínas-MDR, aunque presentan diferencias en su estructura y mecanismo de acción, tienen características comunes como ser compuestos de origen natural, lipofílicos, hidrófobos y con peso molecular entre 300 y 900 Da, que entran en la célula por difusión pasiva (tabla 2)²³.

Tabla 2. Sustratos de Pgp-170.

Compuestos que interactúan con Pgp	
Clase	Compuesto
Fármacos antineoplásicos	Antraciclinas: doxorubicina, daunorubicina. Camptotecinas: Topotecan. Epipodofilotoxinas: Etopósido, tenipsido. Taxanos: paclitaxel, docetaxel. Alcaloides de la vinca: vinblastina, vincristina.
Inhibidores tirosín-cinasa	Imatinib Gefitinib
Productos naturales	Flavonoides Curcuminoides Colchicina Actinomicina D
Colorantes fluorescentes	Rhodamina 123 Hoechst 33342 Calceína AM
Esteroides	Aldosterona Corticoesterona Dexametasona
Analgésicos	Morfina
Antibióticos	Eritromicina
Bloqueadores de canales de calcio	Verapamil Nifedipina Diltizem
Agentes inmunosupresores	Ciclosporina A Tacrolimus

7.2.1. La glicoproteína P estructura y función.

Los transportadores de membrana son proteínas que regulan la entrada de nutrientes esenciales y iones, así como la salida de los productos del metabolismo celular, las toxinas ambientales y otros productos xenobióticos. En lo referente al transporte de los fármacos, los transportadores más representativos son los miembros de dos superfamilias:

- ABC: casete de unión de trifosfato de adenosina (ATP), del inglés *ATP binding cassette*.
- SLC: acarreador de solutos, del inglés *solute carrier*.

La mayor parte de las proteínas ABC corresponden a transportadores activos primarios, que dependen de la hidrólisis del ATP para bombear en forma activa sus sustratos a través de la membrana. Existen 49 genes conocidos para las proteínas ABC, que se pueden agrupar en siete subclases o familias de ABCA a ABCG. Actúan como “bombas de expulsión”, disminuyendo la acumulación intracelular de varias sustancias. Uno de los transportadores

mejor conocidos en la superfamilia ABC es la glicoproteína P, codificada por *ABCB1*, también llamada *MDR1*²⁴.

De los genes de multiresistencia a fármacos, el gen *MDR1* es el más estudiado, localizado en el cromosoma 7. Su producto génico, la glicoproteína P, es una proteína transmembranal de 170-kD (Pgp-170) (figura 5). La Pgp-170 es expresada de manera constitutiva en tejido normal predominante en la membrana plasmática pero también se encuentra en los organelos como lisosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi²⁵.

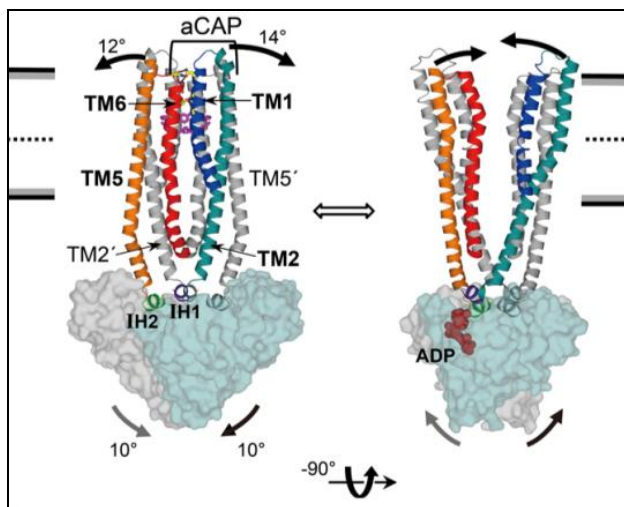


Figura 5. Modelo de la glicoproteína P humana²⁶. Representación esquemática de la proteína Pgp-170 obtenida mediante Rayos X con una resolución de 3.8 Å.

Recientemente, mediante Rayos X con una resolución de 3.8 Å, su estructura ha sido descrita. Esta proteína es un polipéptido formado por dos mitades homólogas, cada mitad comprende seis hélices transmembranales (TMH) y un dominio de unión a nucleótidos (NBD). Las TMH pueden alojar dos moléculas de sustrato simultáneamente y se encuentran en su conformación abierta hacia el interior de la célula²⁶.

La función fisiológica de esta glicoproteína es la de una bomba expulsora dependiente de ATP, que minimiza la exposición de componentes potencialmente tóxicos en el medio intracelular, entre los que se incluyen los fármacos quimioterapéuticos²⁷. Se han propuesto dos modelos mediante el cual la membrana puede participar en la expulsión del sustrato mediante la proteína gp-170. El modelo de aspiradora hidrofóbica (vacuum cleaner), la proteína es capaz de interceptar a los sustratos antes de que entren al citoplasma de la célula y el modelo flipasa (flippase), en donde las moléculas lipofílicas que se encuentran en el citoplasma se traslocan hacia al espacio extracelular (figura 6). Los dos modelos no son excluyentes, pueden ocurrir simultáneamente dependiendo la ubicación del sustrato. Ambos modelos sugieren un reconocimiento del sustrato que provoca la hidrólisis de ATP, que conlleva a un cambio conformacional en las TMH para la apertura de las hélices y expulsión de sustratos²⁸.

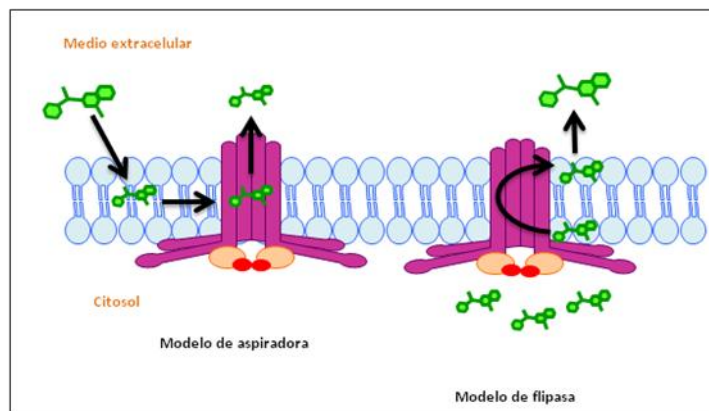


Figura 6. Modelos de expulsión de los sustratos de Pgp-170. Modelo de aspiradora y flipasa. El modelo de aspiradora hidrofóbica, en donde la proteína es capaz de interceptar a los sustratos antes de que entren al citoplasma de la célula y el modelo flipasa donde las moléculas lipofílicas que se encuentran en el citoplasma se traslocan hacia al espacio extracelular.

La expresión de Pgp determina un fenotipo celular resistente a varios productos naturales como son: antraciclinas, alcaloides de la vinca, taxanos, entre otros y a compuestos exógenos como son los bloqueadores de los canales del calcio (verapamil), digoxina, opiáceos, hidrocarburos aromáticos, complejos sintéticos como el Tc99-sestamibi, rodamina 123 o antivíricos como son los inhibidores de proteasas¹⁸.

Se ha demostrado que la sobre-producción de Pgp-170 provoca la secreción de los fármacos que ingresan a la célula y posteriormente, la reducción del contenido intracelular de los mismos^{29,30}. Debido a que muchos fármacos son sustratos de Pgp-170, su grado de expresión y la funcionalidad afecta directamente a la eficacia terapéutica de estos agentes, por lo que se ha propuesto que la expresión de mRNA de *Pgp-170* correlaciona con la agresividad intrínseca del tumor y la resistencia a fármacos, después de la quimioterapia^{31,32}. Así por ejemplo, se conoce que la exposición a fármacos quimioterapéuticos induce la sobreexpresión de la Pgp-170, de manera significativa, en células blásticas^{27,33}. En particular, la resistencia a la quimioterapia se ha convertido en un obstáculo importante en el tratamiento contra el cáncer, pero el mecanismo exacto de regulación de la expresión de la proteína gp-170 no ha sido completamente elucidado.

7.2.2. Regulación de Pgp-170 a través de miRNAs.

Estudios iniciales, se asoció la expresión de los miRNAs con la Pgp-170, por ejemplo en cáncer de ovario como en carcinoma hepatocelular, la Pgp-170 y los miRNAs miR-27 y miR-16, respectivamente, se encuentran sobre-expresados^{34,35}, proponiéndose un vínculo entre estos. Posteriormente la regulación de este gen, se propuso en diferentes tipos de cáncer. Esta regulación puede ser de manera directa, cuando el miRNA se une al UTR-3' del mRNA de Pgp-170 o de manera indirecta, en donde el miRNA se une al mRNA de una proteína intermediaria que regula a Pgp-170. Por ejemplo, de forma directa en cáncer de mama, miR-451 y miR-298

regulan a Pgp-170 de igual manera en Leucemia Mieloide Crónica, miR-331-5P y miR-27a⁴⁰. De manera indirecta en cáncer de mama, se ha visto que miR-505 actúa como un supresor de tumor, al unirse al UTR-3' de la proteína TP53INP1, la cual regula a Pgp-170³⁶.

Por otra parte, no existen reportes del papel de miR-223 en la modulación de MDR1/Pgp-170 en algún tipo de cáncer. De manera interesante, un análisis *in silico* realizado en mi Tesis de licenciatura⁴³, indica que el UTR-3' del mRNA de Pgp-170, presenta un posible sitio de unión a miR-223 (figura 7), lo que sugiere que este miRNA podría regular a MDR1/Pgp-170 de manera postranscripcional. Siendo la función de MDR1 un obstáculo para el tratamiento eficiente contra el cáncer, el encontrar los mecanismos involucrados en la regulación ejercida por los miRNAs, impactará en el entendimiento de la biología que subyace en la resistencia a agentes quimioterapéuticos.

MiR-223 es un microRNA hematopoyético por sus funciones cruciales en el desarrollo del linaje mielóide. Desempeña un papel esencial en la promoción de la diferenciación granulocítica mientras que también se asocia con la supresión de la diferenciación eritrocitaria⁴². En algunos tipos de cáncer, miR-223 se correlaciona con mayor carga tumoral, agresividad de la enfermedad y factores de mal pronóstico³⁸. Este miRNA también está asociado con la artritis reumatoide, sepsis, diabetes tipo 2, e isquemia hepática³⁹.

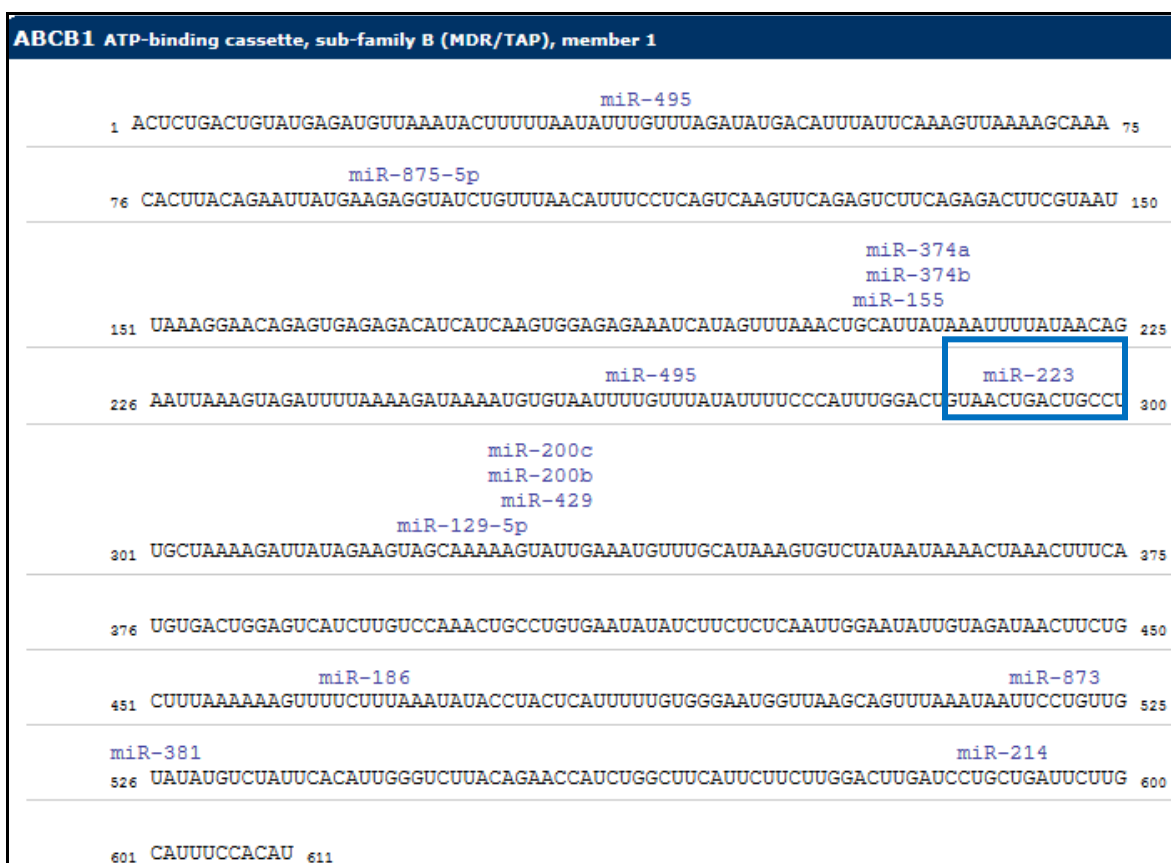


Figura 7. Análisis *in-silico* del UTR-3' del mRNA de Pgp-170. En esta imagen se muestra un posible sitio de unión a miR-223. (www.microRNA.org)⁴³.

8. ANTECEDENTES

La resistencia a la quimioterapia se ha convertido en un obstáculo importante en el tratamiento contra el cáncer, pero el mecanismo exacto de regulación de la expresión de esta proteína no ha sido completamente elucidado. Por lo anterior, es necesario explorar a nivel postranscripcional los mecanismos de regulación de esta proteína, como el que ejercen los microRNAs.

En años recientes, el papel de los miRNAs en la regulación de MDR1, se ha propuesto en diferentes tipos de cánceres. En Leucemia Mieloide Crónica, miR-331-5P y miR-27a están asociados a la resistencia con doxorubicina, mediada por Pgp-170³⁹. En un reporte reciente en células epiteliales de intestino, miR-145 regula la expresión y función de Pgp-170⁴¹. Particularmente en células de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) de linaje T, se ha reportado un conjunto de miRNAs responsables de la supresión cooperativa de tumores, entre los que se encuentran miR-19b, miR-20a y miR-223. Entre estos miRNAs, se ha destacado la participación de miR-223, el cual se ha encontrado sobre-expresado de manera importante en LLA, donde se le ha atribuido un valor pronóstico en este padecimiento^{37,38}. Aunque ha sido reportado que miR-223 interviene en la diferenciación granulocítica⁴², el papel de miR-223 en la modulación de MDR1/Pgp-170 en LLA no ha sido explorado.

En mis estudios de licenciatura se realizó un análisis *in-silico* del UTR-3' de Pgp-170, que sugiere un sitio de unión a miR-223, y se demostró una interacción directa del UTR-3' de mRNA de Pgp-170, a través de miR-223 en células AD-293 mediante ensayos de luciferasa (figura 8)⁴³, en donde se observa que cuando se co-transfecta miR-223 y el UTR-3' de Pgp-170 hay una disminución significativa en la actividad relativa de luciferasa (figura 8 barra verde), restableciendo esta actividad cuando se co-transfecta miR-223 y el UTR-3' de Pgp-170 mutado en la región complementaria al miRNA (secuencia semilla) (figura 8 barra negra).

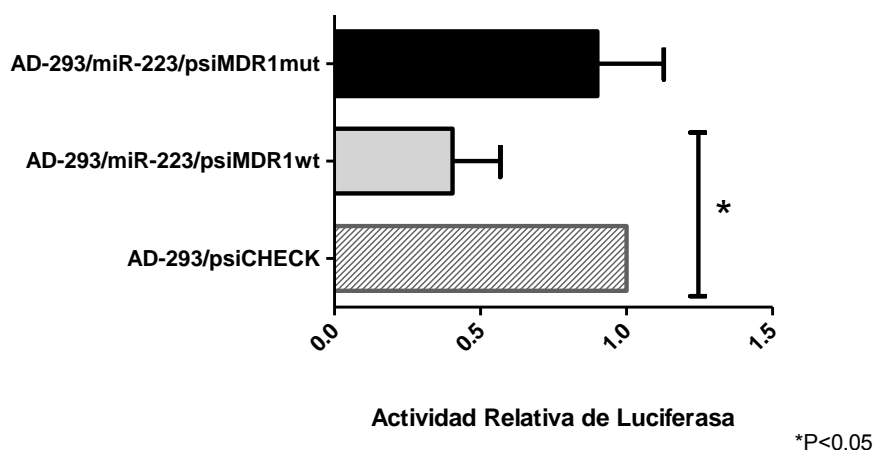


Figura 8. MiR-223 regula de manera postranscripcional a Pgp-170. Células AD-293 fueron co-transfectadas con los vectores pLVX-miR-223, psiCHECK, psi- ABCB1wt y psi- ABCB1mut; 24 hrs postransfección se realizaron ensayos de luciferasa. * p < 0.05.

En el presente trabajo se propuso evaluar si existe una regulación de la proteína gp-170, a través de este miRNA en un modelo de LLA pediátrica (CCRF/CEM-C2), debido a que está reportado que en células de LLA existe una correlación entre resistencia al tratamiento con la sobre-expresión de Pgp-170.

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El aumento en la expresión de Pgp-170, provoca la expulsión de los fármacos que ingresan a la célula, haciendo los tratamientos quimioterapéuticos poco eficientes. El disminuir la expresión de la bomba contribuiría a que estos permanezcan al interior de las células e induzcan una muerte celular por apoptosis. Con base a previos estudios en mi licenciatura fue demostrado que existe una interacción directa ejercida por miR-223 sobre el UTR-3' de MDR1 en células AD-293, en el marco de este proyecto se propone evaluar si la sobre-expresión de miR-223 disminuye los niveles de la proteína Pgp-170 y por consiguiente restablezca la quimiosensibilidad en células LLA pediátricas.

10. HIPOTESIS.

Si miR-223 regula de manera directa a *MDR1* entonces afectara la expresión y funcionalidad de Pgp-170, en células de LLA pediátricas.

11. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la sobre-expresión de miR-223 sobre la expresión y funcionalidad de Pgp-170, en células de LLA pediátricas.

11.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar la expresión de miR-223 y Pgp-170 en las líneas celulares CEM/C2 y CCRF-CEM.
- Diseñar y construir un antagómiro para miR-223, con la finalidad de transfectar el plásmido en la línea celular CEM/C2.
- Evaluar el nivel de expresión de Pgp-170 en ambas líneas celulares postransfección del antagómiro de miR-223.
- Determinar el eflujo de rodamina 123 en las células con y sin expresión de miR-223.

12. METODOLOGÍA.

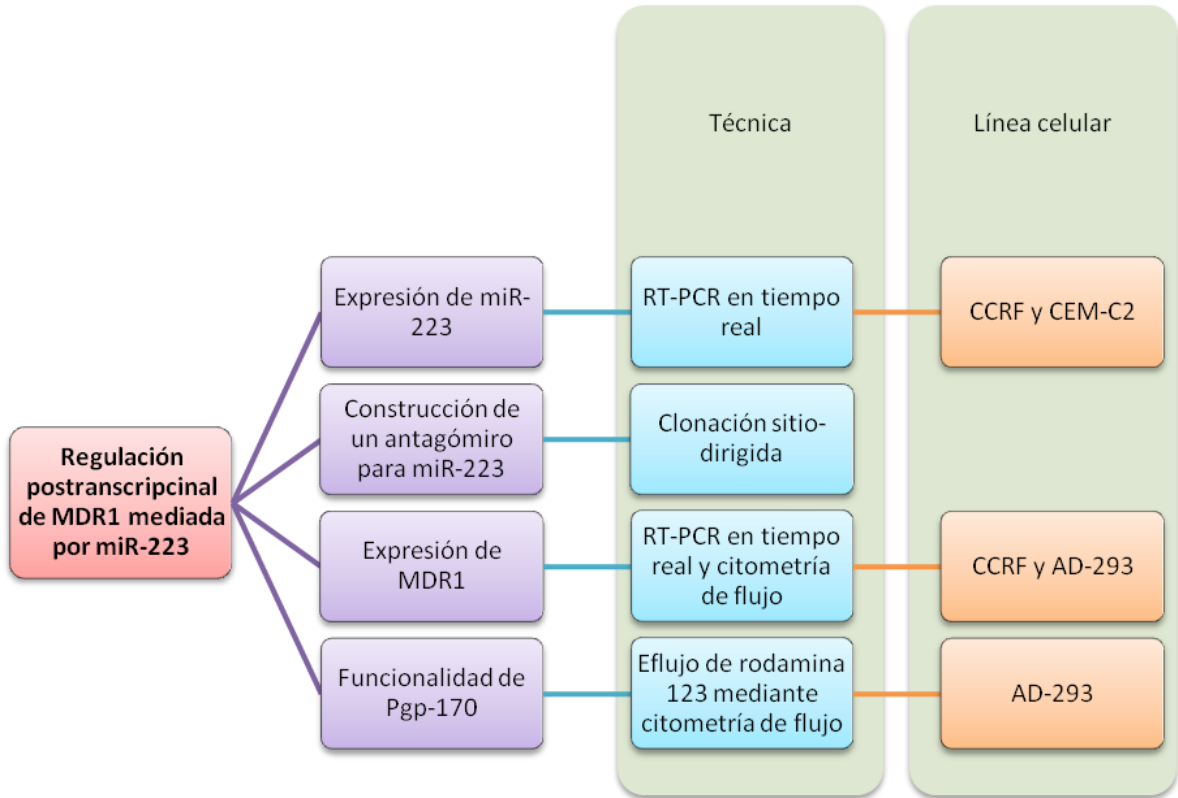


Figura 9. Metodología experimental. Para evaluar la expresión de miR-223 se realizó RT-PCR en tiempo real en las líneas celulares CCRF y CEM-C2, posteriormente se construyó un antagóniro para miR-223 mediante clonación sitio dirigida, después se evaluó la expresión de MDR1 mediante RT-PCR en tiempo real y citometría de flujo en las líneas celulares CCRF y AD-293 y finalmente se realizó el eflujo de rodamina 123 para evaluar la funcionalidad de la bomba con la técnica de citometría de flujo.

13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

13.1. Nivel de expresión de miR-223 por PCR en tiempo real.

En el presente proyecto se seleccionó un modelo de LLA pediátrica, debido a que en la población pediátrica la quimiorresistencia a fármacos por bombas expulsoras (Pgp-170) es una de las principales causas de muerte, por lo que describir la regulación postranscripcional de Pgp-170 medida por miR-223 es relevante. Se utilizó la línea celular CCRF-CEM de LLA de células T, la cual deriva de una niña caucásica, de 4 años, así como también la línea CEM/C2 proveniente de las CCRF-CEM, las cuales son resistentes a diversos fármacos como: etopósido, dactinomicina, bleomicina, mitoxantrona, 4'-(9-acridinilamina) metanosulfonamida-manisidida, y las antraciclinas daunorrubicina y doxorrubicina, aunque conservan la sensibilidad a la vincristina. Cabe mencionar que la resistencia de las células CEM/C2 no está asociada a bombas expulsoras de fármacos, sino que es causada por una mutación en la Topoisomerasa I.

Inicialmente, para conocer la expresión endógena de miR-223 en las líneas celulares CCRF-CEM y CEM/C2, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real. Primero, se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA), utilizando el kit comercial "TaqMan MicroRNA Reverse Transcription System" (Applied Biosystems), a partir de 300 ng de RNA total, extraído con el kit comercial "mirVana miRNA isolation kit" (Ambion). El coctel contenía dNTPs 100 mM, enzima Multiscribe™ RT (50 U/μl), buffer RT 10X, 20U/μl inhibidor de RNasa, oligonucleótidos RT específico para miR-223 (tabla 3) y agua libre de nucleasas para un volumen final de 15 μl. Las condiciones de la reacción de retro-transcripción fueron: 1 ciclo a 16 °C/30 min, 1 ciclo a 42°C/30 min y 1 ciclo a 85°C/5 min.

Una vez obtenido el cDNA, se realizó la PCR en tiempo real, empleando el sistema comercial TaqMan Universal Master Mix II (Applied biosystem), 1.33 μl de cDNA (dilución 1/100), 5 μl de una sonda TaqMan acoplada con el fluoróforo 6-FAM (10 μM), 2.5 μl del oligonucleótido sentido y anti-sentido para miR-223 (tabla 3) y agua libre de nucleasas, para una reacción final de 25 μl. Las condiciones de amplificación fueron: a) 1 ciclo 50 °C/2 min, b) 1 ciclo 95°C/10 min, c) 40 ciclos con desnaturalización 95°C/15 s, alineamiento/extensión 60°C/1 min y d) 1 ciclo 25°C/10 min. Como control endógeno, se amplificó el RNA pequeño nuclear U6, el cual tiene un nivel de expresión constitutiva, por lo que es abundante y cuya expresión no debe cambiar en ninguna condición experimental.

El número de veces de cambio de miR-223 (expresión relativa), entre las dos líneas celulares de interés CCRF-CEM y CEM/C2, se calculó mediante los ciclos umbral (CT).

Cálculo de la expresión relativa:

$$\Delta C_t = (C_t \text{ del gen de interes} - C_t \text{ del control interno}) \text{ linea A (CCRF)}$$
$$\Delta C_t = (C_t \text{ del gen de interes} - C_t \text{ del control interno}) \text{ linea B (CEM/C2)}$$
$$\text{Numero de veces de cambio} = \Delta C_t A / \Delta C_t B.$$

Tabla 3. Oligonucleótidos para RT-PCR en tiempo real.

Oligonucleótido	Secuencia
RT- miR-223	5'-GCGACTGTTCCCTCTCTTCCTCTGTGTGTGTGTGTGTAGTCGCAATGGGGT-3'
miR-223 sentido	5'-GAGTGTCAGTTTGTCAAAT-3'
miR-223 antisentido	5' -GACTGTTCCCTCTTCCTC-3'

13.2. Nivel de expresión de *MDR1* y *Pgp-170*.

La evaluación de la expresión del mRNA de *MDR1* se llevó a cabo en las líneas celulares CCRF-CEM y CEM/C2, mediante RT-PCR en tiempo real. Primero, se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA), utilizando la "SuperScript II Reverse Transcriptase" (Invitrogen), a partir de 300 ng de RNA total, Oligo(dT) 500 µg/mL, dNTPs 10 mM, DDT 0.1 M, 5x Buffer de síntesis de la primera cadena, enzima RT SuperScript 200U y agua libre de nucleasas, para un volumen final de 20 µl.

Posteriormente, se realizó la PCR en tiempo real, empleando el sistema comercial "Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG" (Invitrogen), 2 µl de cDNA, 12.5 µl de Platinum SYBR Green Mix acoplada al fluoróforo SYBR Green I, oligonucleótidos sentido y antisentido para *MDR1*, 10 µM (tabla 3) y agua libre de nucleasas para una reacción final de 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron: a) 1 ciclo 50 °C/2 min, b) 1 ciclo 95°C/2 min, c) 40 ciclos con desnaturalización 95°C/15 seg, alineamiento/extensión 60°C/30 seg y d) 1 ciclo 25°C/10 min. Como control endógeno, se evaluó la expresión del gen β - actina.

De la misma manera que miR-223 la expresión relativa para *MDR1* entre las dos líneas celulares CCRF-CEM y CEM/C2 se calculó mediante el Δ Ct.

Para evaluar el nivel de expresión de la proteína gp-170, en las células CCRF-CEM y AD-293, se realizaron ensayos de citometría de flujo, las células CEM/C2 fueron descartadas ya que la resistencia a múltiples fármacos que poseen es debido a una mutación en la Topoisomerasa I y no por un efecto debido a la sobre-expresión de bombas expulsoras de fármacos. Para los ensayos, se fijaron y permeabilizaron 1×10^5 células con el reactivo Cytofix/Cytoperm (BD). Posteriormente, las células fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal para gp-170 acoplado a ficoeritrina (PE-anti-human CD243; BioLegend), a una dilución 1:50 y como control de isotipo se utilizó el anticuerpo PE-IgG2a, κ (BioLegend), a la misma dilución. Las células fueron analizadas con el filtro FL2 (585/40) usando el citómetro BD Accuri C6 (Becton Dickinson). El análisis de datos se realizó en 10, 000 células viables, utilizando el colorante de ácidos nucleicos 7-Actinomicina D (7AAD) Becton Dickinson (BD), el cual nos permite excluir las células muertas de las vivas. El grado de intensidad de fluorescencia se expresó como intensidad de fluorescencia media (IFM).

13.3. Construcción de antagómiros para miR-223.

Para la construcción de los antagómiros fue necesario diseñar y construir un sistema de expresión de antagómiros que permitieran modular la expresión de miR-223, al secuestrar estas moléculas de expresión endógena. Para construir el antagómiro para miR-223, se diseñaron oligonucleótidos para generar una secuencia de doble cadena (dsODN), que contenían un sitio de unión para miR-223 (configuración sencilla) o 4 sitios de unión (configuración en tándem). Esta última configuración recibe el nombre de microRNA esponja, ya que permite “absorber” miRNAs y por tanto disminuir la cantidad estas moléculas.

Primero se generó un oligonucleótido de doble cadena (dsODN), de 33 pb para el antagómiro sencillo y 110 pb para la versión en tándem que contenía el sitio de unión de miR-223. La reacción de hibridación se llevó a cabo calentando cantidades equimolares de cada oligonucleótido (100 μ M), en agua libre de nucleasas, a 95 °C/ 5 min y la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Para clonar los oligonucleótidos, el vector pLVX-shRNA2 fue doblemente digerido con las enzimas BamHI/EcoRI (Clontech), los oligonucleótidos en su diseño contienen los sitios de restricción correspondientes. La ligación del inserto al vector, se hizo en un ratio 3:1 (300 ng inserto/100 ng vector), utilizando 1 μ l (400 U/ μ l) la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen), buffer de ligasa 10X y agua libre de nucleasas para un volumen final de 15 μ l. La reacción fue incubada a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente, 1hr a 37°C y almacenada hasta su transformación a 4°C.

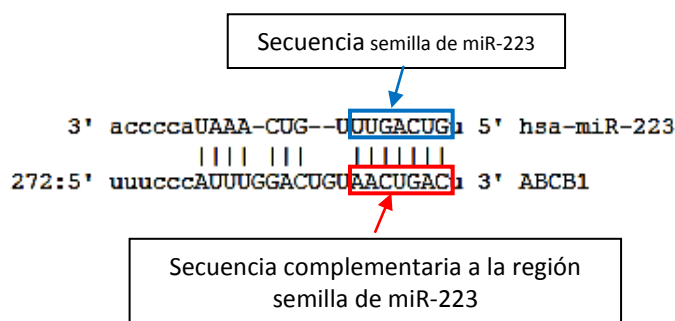
La transformación bacteriana de *E.coli* DH5 α , mediante choque térmico a 42 °C. Las transformantes, se plaquearon en platos con medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) e incubaron a 37 °C durante 16 h. Después de este tiempo, se seleccionaron 5 colonias para purificar el DNA plasmídico por el sistema comercial PureYield™ plasmid midiprep system (Promega), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El DNA plasmídico fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro nanodrop (Thermo Scientific) y analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

La integridad de la secuencia de nucleótidos de la secuencia que da origen al shRNA fue corroborada mediante secuenciación capilar (ABI Prism 3200, AppliedBiosystem). Los vectores fueron denominados pLVX-anti-miR-223 para la configuración sencilla y pLVX-anti-miR-223-4 para la configuración en tándem (tabla 4).

Tabla 4. Secuencia de los antagómiros de miR-223.

Antagómiro	Secuencia
Sencillo pLVX-anti-miR-223	5'-GATCCGGGGTATTTGACA AACTGAC ATTTTTTG-3'
Tándem pLVX-anti-miR-223 (4)	5'-GATCCGGGGTATTTGACA AACTGAC ACGATGGGGTATTTGACA AACTGACA ACCGGTGGGGTATTTGACA AACTGAC ATCACGGGGTATTTGACA AACTGAC ATTTTTTG-3'

AACTGAC secuencia complementaria a la región semilla de miR-223.



13.4. Transducción de células CCRF mediante partículas virales.

El transfectar células leucémicas es difícil, por lo que se decidió generar partículas virales que expresarán eficientemente los antagómiros de miR-223, utilizando el sistema comercial “Lenti-X shRNA Expression System” (Clontech), con el cual es posible generar virus incompetentes de replicación, lo que permite su manipulación de manera controlada, bajo un esquema de bioseguridad BSLII. El sistema de expresión Lenti-X shRNA que consiste en la generación de lentivirus VSV-G, a partir de vectores lentivirales basados en el virus de VIH-1 para introducir RNAs pequeños horquillados (shRNA) en las células de interés con el propósito de suprimir la expresión de genes específicos a través de la interferencia de RNA (RNAi). Para poder producir lentivirus infecciosos, se co-transfecta en células HEK-293T (línea celular optimizada por el fabricante del kit para la producción de virus) el vector pLVX-shRNA2 que contiene la secuencia del antagómiro y el mix con los componentes de empaquetamiento viral (Lenti-X HTX Mix) utilizando el reactivo de transfección Xfect. 48 hrs postransfección se recolectan los sobrenadantes que contienen las partículas virales, con lo que se transduciran las células leucémicas. El vector pLVX-shRNA2 contiene la proteína verde fluorescente (ZsGreen1) como marcador de, que le permite identificar fácilmente las células transducidas. En el laboratorio se han generado los vectores pLVX-miR-223, pLVX-miR-138, pLVX-scramble, pLVX-anti-miR-223 y pLVX-anti-miR-223 tándem, que podrán ser empaquetados.

Se sembraron las células HEK-293T a una densidad de 5×10^6 células, en placas 100 mm con medio DMEM Advanced (Invitrogen) con SFB, libre de tetraciclina al 10 % (Clontech) y se

transfectaron conforme las instrucciones de fabricante (tabla 5). 24-48 hrs postransfección, se observa la eficiencia de transfección del vector por microscopía de epifluorescencia.

Tabla 5 . Mezcla de empaquetamiento viral.

TUBO 1 (DNA PLASMIDICO)		TUBO 2 (POLIMERO)	
Xfect buffer	557.0 μ l	Xfect reaction buffer	592.5 μ l
Lenti H-packaging mix	37.0 μ l	Xfect polimer	7.5 μ l
pLVX-shRNA DNA (1 μ g/ μ l)	7.0 μ l		
Volumen total	600.0 μ l	Volumen total	600.0 μ l

Para evaluar la producción de las partículas virales, se utilizaron tiras reactivas (GoStix), las cuales detectan la proteína p24 de la capsida de los viriones, dependiendo si se producen viriones a un título adecuado. La prueba es positiva (+) cuando el numero de Unidades Infecciosas por mililitro (IFU/mL) es mayor a 5×10^5 , y de forma visual puedes observar dos bandas teñidas: una banda control (C) y una banda para el sobrenadante muestra (T). Esta prueba contiene anticuerpos anti-p24 para detectar a la proteína de la capsida (figura 10).

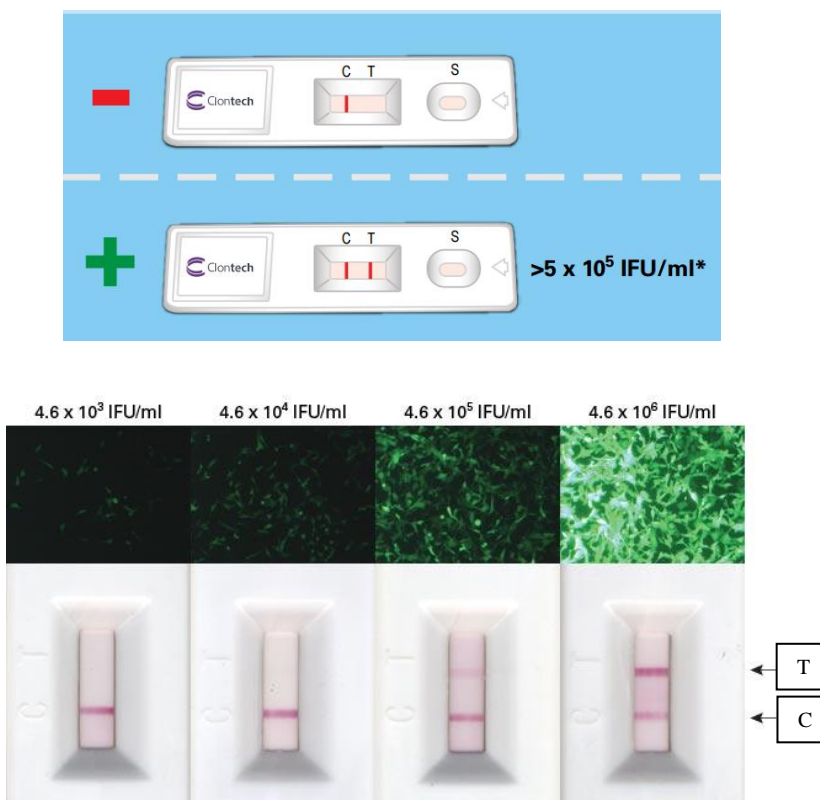


Figura 10. Prueba GoStix. Cuando la prueba es negativa (-) se observa solo una banda teñida en el control (C) y cuando la prueba es positiva (+) se observan dos bandas teñidas: una una banda control (C) y una banda para el sobrenadante muestra (T).

13.5. Modulación del nivel de expresión de Pgp-170 mediante miR-223.

Para evaluar el efecto de miR-223 sobre la expresión de Pgp-170, en la línea celular CCRF era necesario transducir con partículas virales que contuvieran los antagómiros. Debido a que no fue posible obtener un adecuado título viral, y la finalidad del proyecto es la descripción del mecanismo de regulación postranscripcional de miR-223 sobre Pgp-170, se decidió continuar los experimentos en las células AD-293 (células de riñón), modelo utilizado en mi tesis de licenciatura⁴³, las cuales son células muy fáciles de transfectar por agentes lipofílicos al ser adherentes. Por otra parte, las células AD-293 no tienen una expresión endógena de miR-223 (corroborado por RT-PCR tiempo real en mi tesis de licenciatura), por lo que se transfectaron con un plásmido que expresa este miRNA (pLVX-miR-223), plásmido recombinante generado anteriormente⁴². Las células son sembradas con una densidad de 1×10^5 en placas de 6 pozos, con medio DMEM Advanced (Invitrogen). Al día siguiente, las células son transfectadas con $1 \mu\text{g}$ de los plásmidos y $6 \mu\text{l}$ del agente transfectante Turbofect (Thermo). Después de 24 h postransfección, las células se cosecharon y se evaluó el nivel de Pgp-170, mediante citometría de flujo, como previamente se describió.

13.6. Ensayos de funcionalidad de la bomba Pgp-170.

13.6.1. Evaluación del eflujo de rodamina 123.

La evaluación de eflujo de rodamina 123 se realizó mediante citometría de flujo. Las células AD-293 fueron sembradas a una densidad de 1×10^5 por pozos, en placas de 6 pozos, con medio DMEM Advanced (Invitrogen). Al día siguiente, las células se transfectaron con 10 nM del mimico de miR-223 (Ambion) o con 10 nM de un control negativo comercial para miRNAs (Dharmacon) y $6 \mu\text{l}$ del agente transfectante Turbofect (Thermo). Después de 24 hrs postransfección, las células fueron tratadas con 50 ng de rodamina 123 (Sigma) y se incubaron 10 min a 37°C en una atmósfera de CO_2 . Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS) frío y se incubaron 1 h en 2 ml de PBS A 37°C . Las células fueron analizadas a los 10 min (rodamina inicial; Rod i) y a la hora (rodamina final; Rod f) usando el filtro FL1 (533/30) en el citómetro BD Accuri C6 (BD). La adquisición y análisis de datos se realizaron en 10,000 células viables, utilizando el colorante de ácidos nucleicos 7-Actinomicina D (7AAD) (BD), el cual permite la exclusión de las células muertas de las vivas. El grado de intensidad de fluorescencia se expresó como intensidad de fluorescencia media (MFI). Como control positivo de inhibición se utilizaron dos fármacos de uso clínico, Ciclosporina A (Novartis) a concentraciones $0.5 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$ y 10 nM y Verapamil (Kener) a concentraciones $0.01 \mu\text{M}$, $0.1 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$.

14. RESULTADOS

14.1. Expresión endógena de miR-223 en células CCRF-CEM y CEM/C2.

En el primer objetivo se planteó evaluar la expresión de miR-223 en las líneas celulares CCRF-CEM y CEM/C2, esta última resistente a diversos fármacos por una mutación en la Topoisomerasa I, no por una exposición prolongada a fármacos. Por lo que en ensayos posteriores no será relevante su uso.

Se evaluó la expresión de miR-223 mediante RT-PCR en tiempo real, donde se mostró que hay una expresión endógena de miR-223, en ambas líneas de LLA (figura 11). Sin embargo, se observó una mayor expresión en la línea celular CCRF, en comparación con las células multidrogo-resistentes CEM/C2. Como control endógeno, se amplificó el RNA pequeño nuclear U6, el cual tiene un nivel de expresión constante.

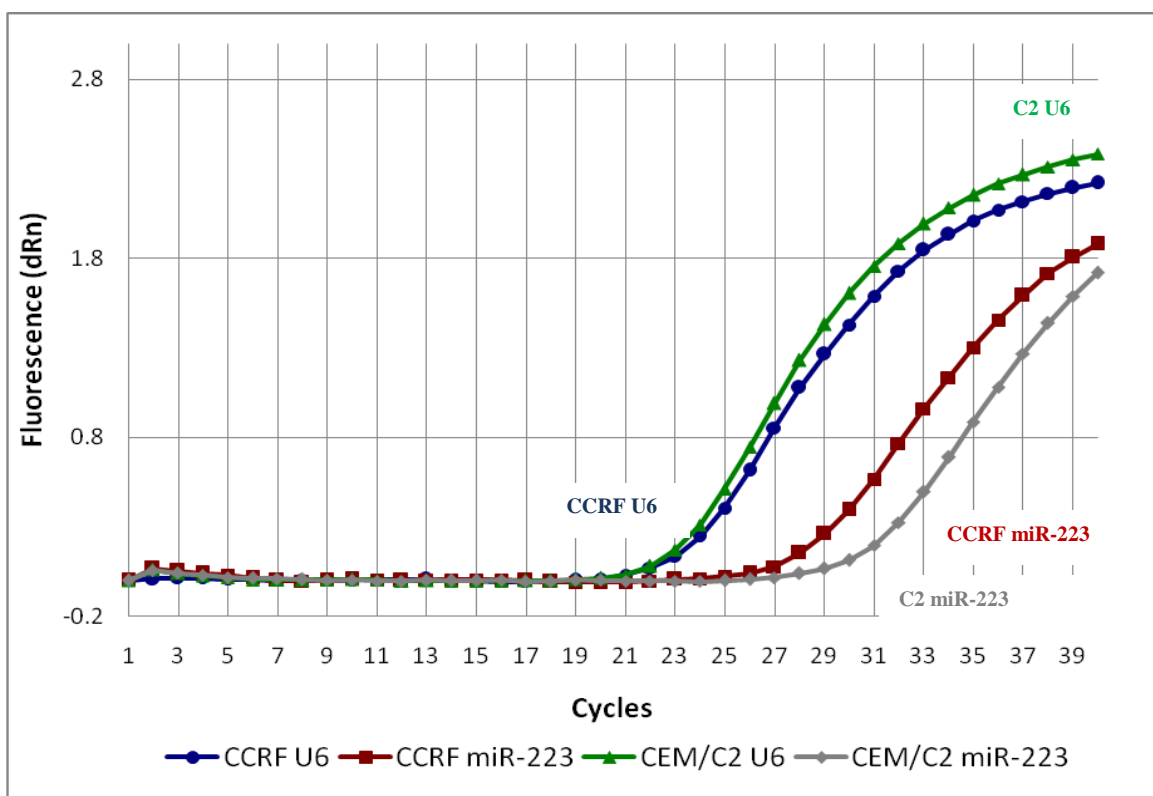


Figura 11. Gráfica de amplificación de miR-223 y U6, mediante RT-PCR en tiempo real, apartir de RNA total obtenido de las células CCRF y CEM/C2. Se utilizó como control U6.

Para comparar los niveles de expresión en las dos líneas celulares CCRF-CEM y CEM/C2, se realizaron tres experimentos independientes (figura 12). El valor C_t (ciclo donde inicia la amplificación) indica el nivel de expresión de miR-223, en donde a menor valor C_t indica una mayor expresión del miRNA y viceversa. Con base en lo anterior, pudimos observar que hay

una mayor expresión de miR-223 en las células CCRF, al tener un menor valor de C_t que las células CEM/C2 resistentes (figura 12-A). Después de calcularse la expresión relativa de miR-223, se observó que existe una disminución de ~ 90 % en las células C2 resistentes, en comparación con las células CCRF (figura 12-B).

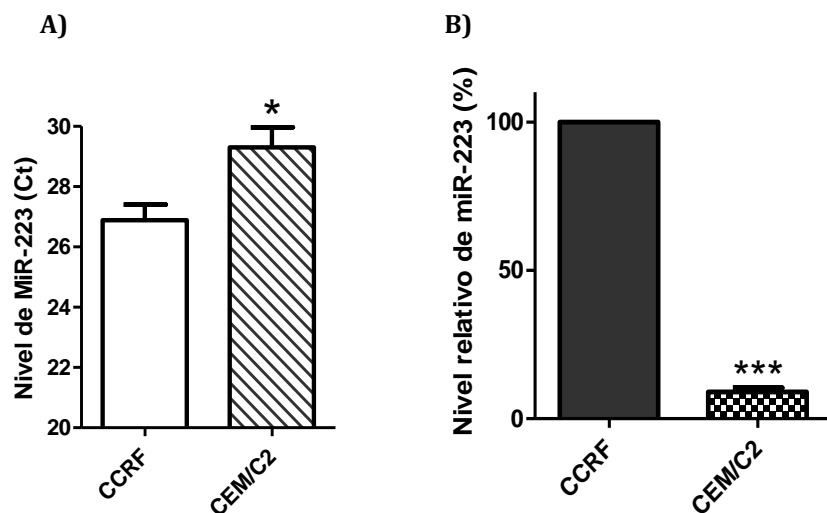


Figura 12. Expresión de miR-223 en células CCRF y CEM/C2. A) Valores de C_t o B) Niveles de expresión relativa, evaluado por RT-PCR en tiempo real. $p < 0.05$.

14.2. Nivel endógeno de *MDR1* y *Pgp-170*.

Por otro lado, se evaluó la expresión del transcrito de *MDR1* en las células CCRF y se comparó con el nivel de expresión de las células resistentes CEM/C2 (figura 13), observándose una mayor expresión en las CCRF con respecto a las C2. Considerando el parámetro de los C_t (Figura 14-A), en donde se observó que las células C2 resistentes tienen un mayor C_t y por tanto una menor expresión con respecto a las células CCRF, al calcular el porcentaje de expresión relativa de *MDR1*, se obtuvo que la diferencia en expresión de *MDR1* es de ~88% en las células CEM/C2, con respecto a las CCRF (figura 14-B).

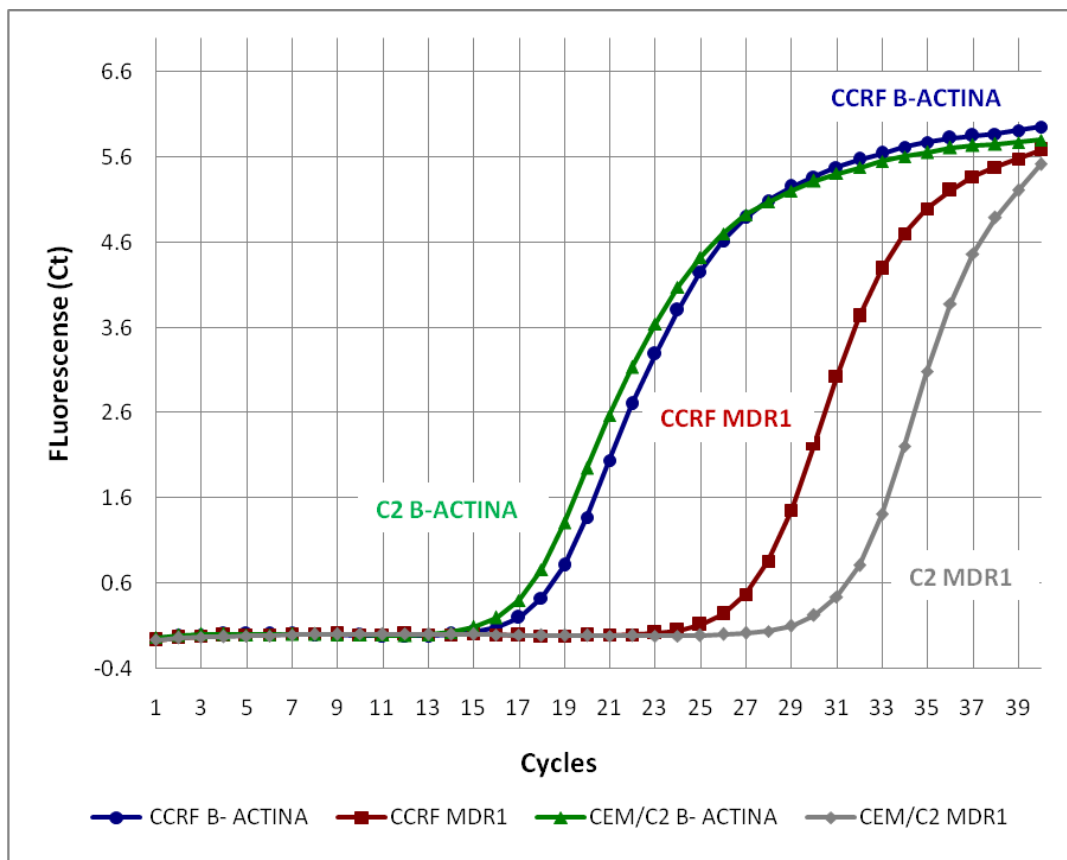


Figura 13. Gráfica de amplificación de MDR1 y β -Actina como control por RT-PCR en tiempo real, a partir de RNA total de las células CCRF y CEM/C2.

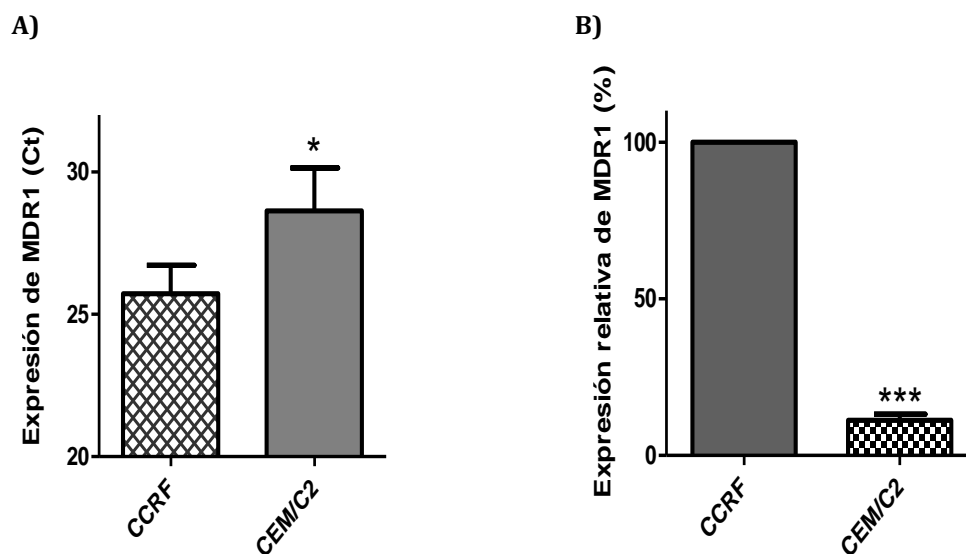


Figura 14. Expresión de MDR1 en células CCRF y CEM/C2. A) Valores de C_t o B) Niveles de expresión relativa, evaluado por RT-PCR en tiempo real. $p < 0.05$.

También se evaluó la expresión de la Pgp-170, mediante ensayos de citometría de flujo en la línea celular CCRF de LLA, descartando la línea celular CEM/C2 debido a la mutación en la topoisomerasa I, el ensayo también se realizó en las células AD-293, debido a que no fue posible obtener un adecuado título viral, y la finalidad del proyecto es la descripción del mecanismo de regulación postranscripcional de miR-223 sobre Pgp-170 en un modelo que permita las condiciones experimentales, las células AD-293 (células de riñón), fueron el modelo de estudio utilizado en mi tesis de licenciatura⁴³, las cuales son células muy fáciles de transfectar por agentes lipofílicos al ser adherentes. Inicialmente, se realizaron las tinciones con el anticuerpo anti-MDR1 en estas células pero no se observó una expresión abundante de la proteína gp-170 en la superficie celular por lo que se decidió permeabilizar las células, debido a que en los organelos como lisosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi también se expresa esta proteína²⁵. Permeabilizando las células se observó una expresión abundante de la proteína tanto en la línea celular AD-293 y CCRF (Figura 15 y 16).

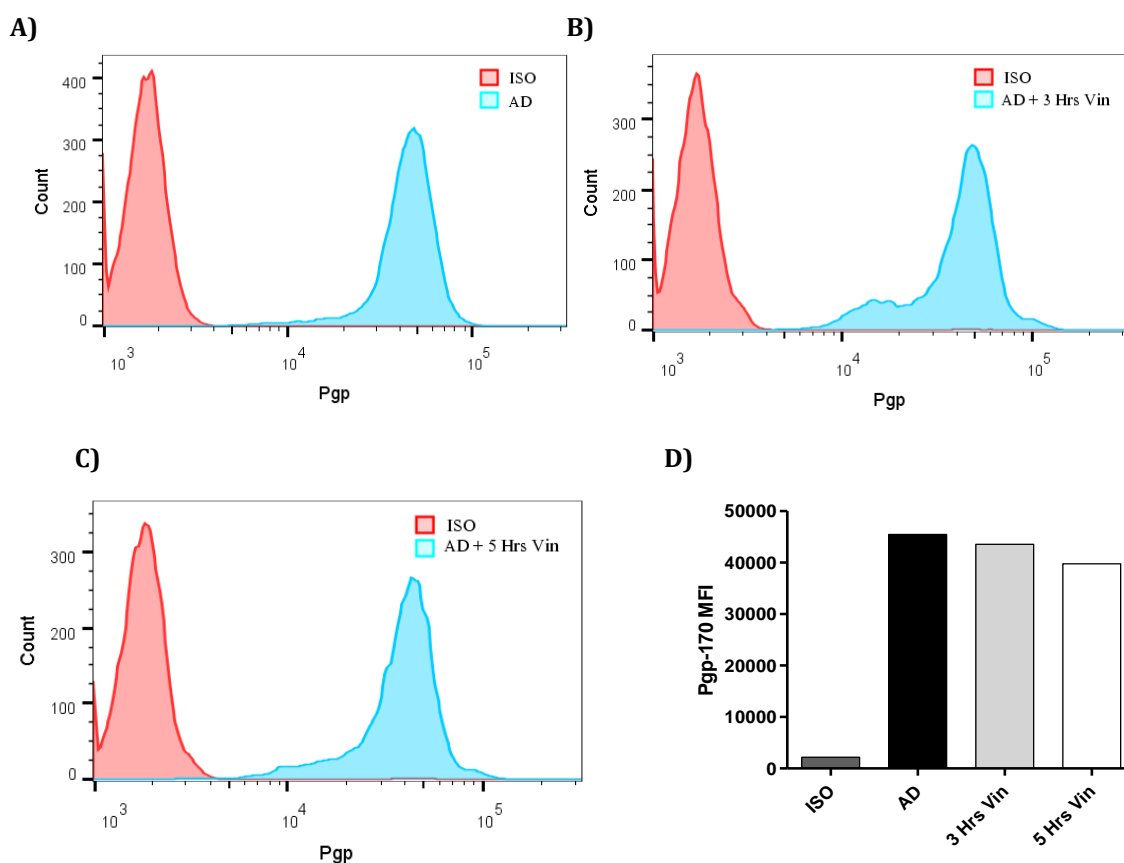


Figura 15. Expresión de Pgp-170 en células AD-293. Las células se permeabilizaron y fueron teñidas con el anticuerpo anti-CD243-PE (MDR-1) y analizadas por citometría de flujo. A) Células AD-293 sin tratamiento, B) Tratadas con vincristina durante 3 hrs, C) Tratadas con vincristina durante 5 hrs, D) Gráfica de las Intensidades de Fluorescencia Media (MFI) de los diferentes tratamientos; ISO: control de isotipo, AD: células AD-293 sin tratamientos, 3 Hrs Vin: Células tratadas con 5 μ M de Vincristina durante 3 horas previas al ensayo y 5 Hrs Vin: Células tratadas con 5 μ M de Vincristina durante 5 horas previas al ensayo. El análisis fue realizado con 10 000 células viables.

Con la finalidad de observar una mayor expresión de la proteína Pgp-170^{27,33}, las células AD-293 y CCRF fueron tratadas con 5 μ M de vincristina en un periodo de 3-5 hrs antes de realizar la adquisición de los eventos.

Como se muestra en los histogramas de las figuras 15 y 16, no existe diferencia entre los tratamientos con vincristina (3 o 5 hrs) y las células sin tratar, en ambas líneas celulares. En las gráficas 15-D y 16-D observamos la expresión de la proteína en donde no hay una diferencia significativa entre el tratamiento con el fármaco o las células sin tratamiento, por lo que el tratamiento con vincristina no incrementa el nivel de expresión de gp-170, a esta concentración y tiempo de tratamiento evaluado.

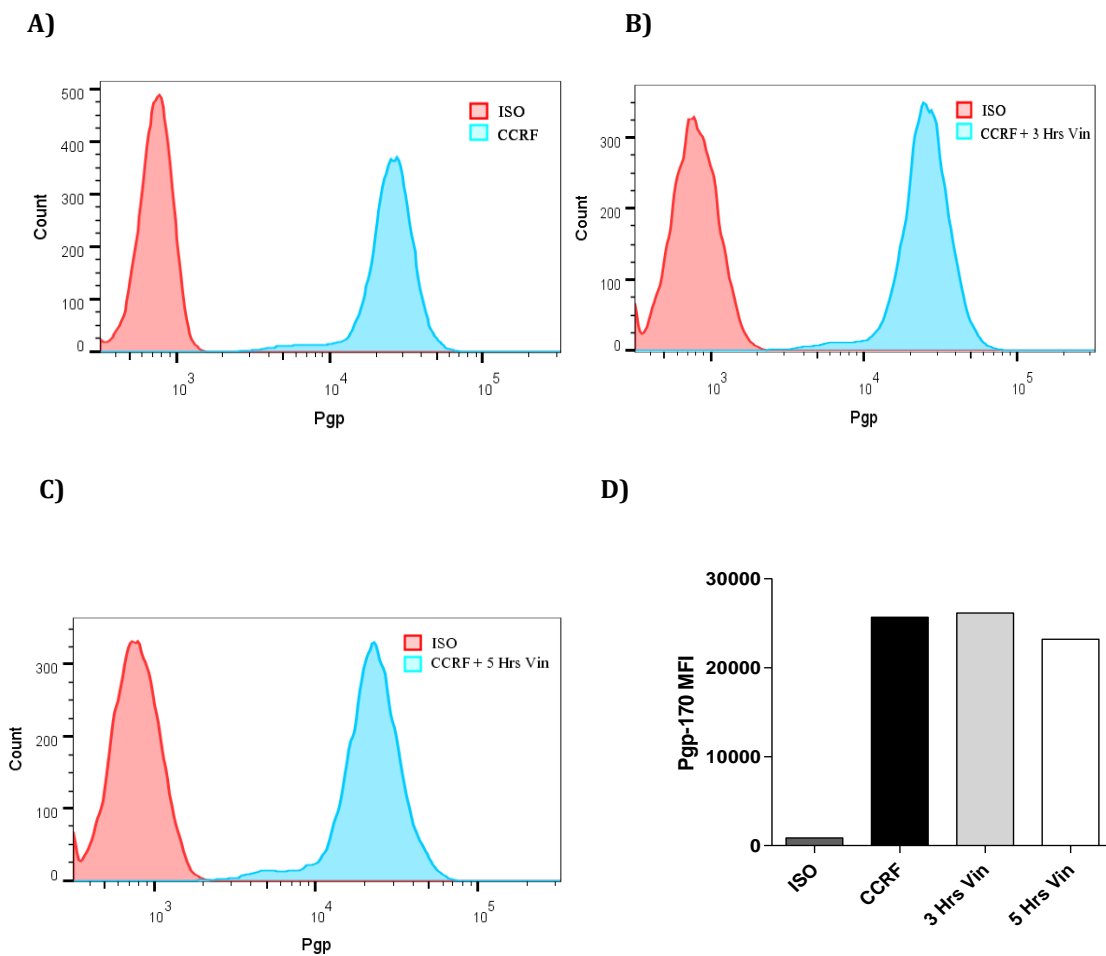


Figura 16. Expresión de Pgp-170 en células CCRF. Las células se permeabilizaron y fueron teñidas con el anticuerpo anti-CD243-PE (MDR-1) y analizadas por citometría de flujo. A) células sin tratamiento, B) tratadas con vincristina durante 3 hrs, c) tratadas con vincristina durante 5 hrs, D) Gráfica de las Intensidades de Fluorescencia Media (MFI) de los diferentes tratamientos; ISO: control de isotipo, AD: células AD-293 sin tratamientos, 3 Hrs Vin: Células tratadas con 5 μ M de Vincristina durante 3 horas, previas al ensayo y 5 Hrs Vin: Células tratadas con 5 μ M de Vincristina durante 5 horas, previas al ensayo. El análisis fue realizado con 10 000 células viables.

14.3. Generación de antagómiros para miR-223.

Los antagómiros son secuencias complementarias de unión a un miRNAs (a la secuencia semilla), que al interactuar con los miRNAs inhiben su función debido a que evitan que se unan a sus secuencias diana. La estrategia fue construir un antagómiro para miR-223 con un solo sitio de unión (sencillo) y uno con cuatro sitios de unión para miR-223 (en tándem). Se decidió colocar cuatro sitios de unión para miR-223 para que la secuencia no fuera tan larga, evitando formación de estructuras secundarias que enmascaren los sitios de emparejamiento con el miRNA. La construcción de los antagómiros se realizó con la finalidad de observar cual de estos tiene una mayor capacidad de secuestro y así observar un aumento en los niveles de expresión de la proteína.

Para esto se diseñaron oligonucleótidos que después de hibridarlos generan una secuencia de doble cadena (dsODN, del inglés “double-stranded OligoDeoxyNucleotide”), que fue clonada de manera sitio-dirigida. Como se muestra en la figura 17, después de una digestión con las enzimas de EcoRI/BamHI, se libera un fragmento de 110 pb, correspondiente a la secuencia del antagómiro en tándem.

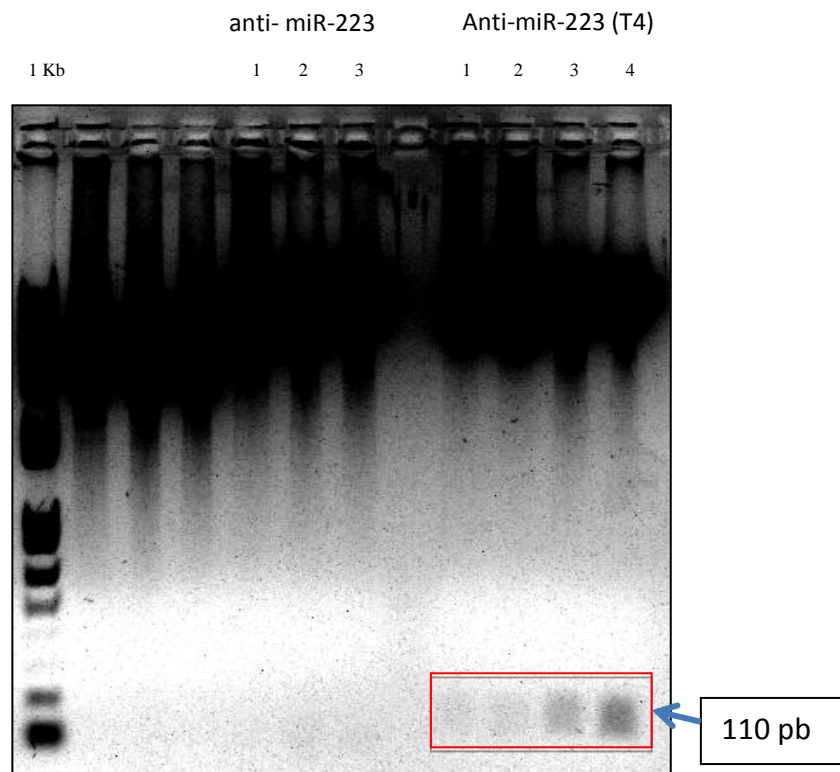


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de la digestión EcoRI/BamHI del vector pLVX-shRNA2 (Clontech). En el primer carril podemos observar el marcador de tamaño, en los carriles 9, 10, 11 y 12 observamos el fragmento de 110 pb del antagómiro en tándem de cuatro clonas diferentes.

Para corroborar la integridad de las secuencias, se analizó mediante secuenciación capilar y se confirmó que la secuencia clonada no tuviera algún cambio en la composición de nucleótidos. Los vectores fueron denominados pLVX-anti-miR-223 para la configuración sencilla y pLVX-anti-miR-223 (4) para la configuración en tándem (figura 18 y 19).

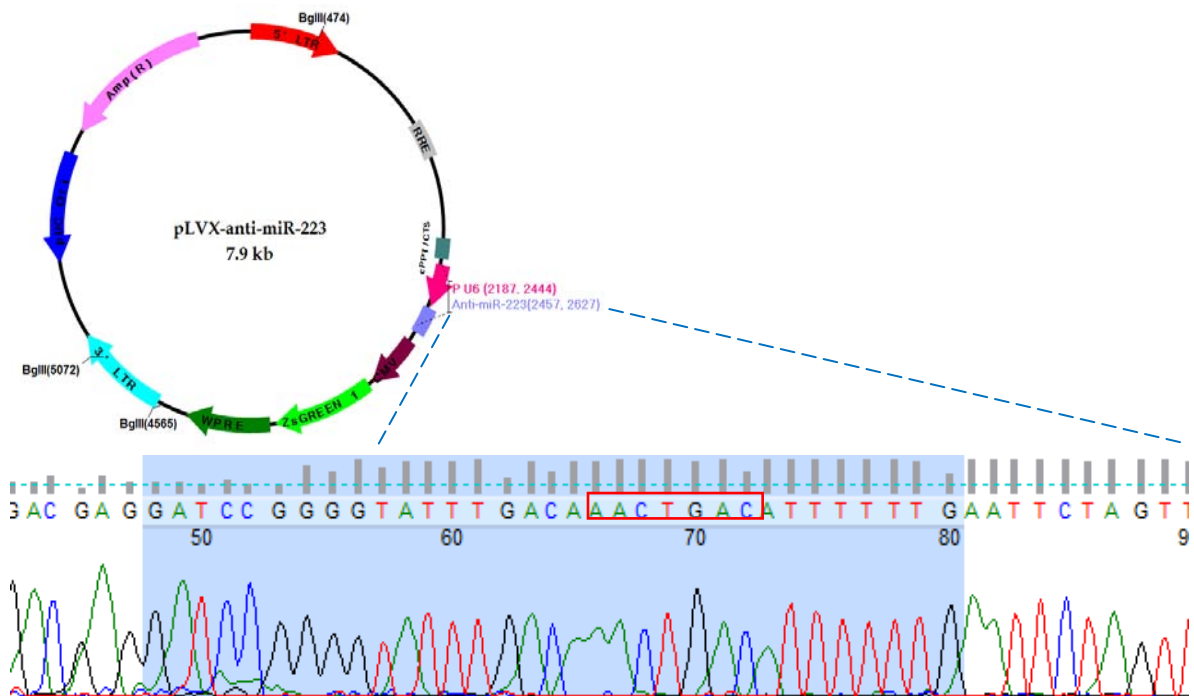


Figura 18. Electroferograma de la secuencia del antagómiro sencillo de miR-223. Secuencia que se observa en la tabla 4.

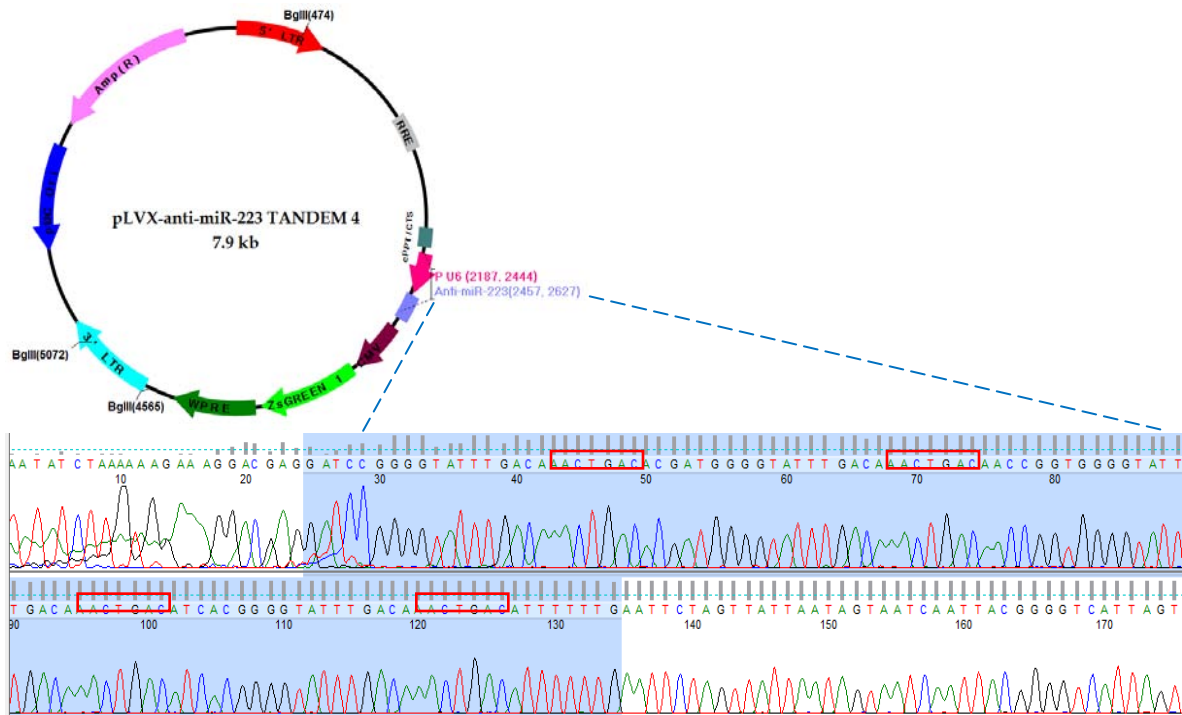


Figura 19. Electroferograma de la secuencia del antagonismo en tándem de miR-223. Secuencia que se observa en la tabla 4.

14.4 Producción de viriones para la transducción de las células CCRF-CEM.

El tercer objetivo comprendía la evaluación de Pgp-170 mediante citometría de flujo, después de la transfección con los plásmidos que expresan los antagonismos de miR-223 (pLVX-anti-miR-223 secillo y en tándem). Para lograr lo anterior se necesitaba producir partículas virales para infectar a las células CCRF-CEM, debido a que estas células crecen en suspensión y son difíciles de transfectar mediante métodos lipofílicos o de electroporación.

Para la producción de partículas virales se comenzó la estandarización con algunos vectores construidos en el laboratorio (pLVX-scramble y pLVX-miR-138), inicialmente la transfección se realizó en células adherentes HEK293T con los vectores pLVX-scramble y pLVX-miR-138, estos expresan la proteína verde fluorescente (ZsGreen1) como marcador fluorescente de transfección y/o transducción. Se observó una eficiencia de transfección superior al 80%, tanto a las 24 y 48 h para ambos vectores pLVX-scramble y pLVX-miR-138 (figuras 20 y 21).

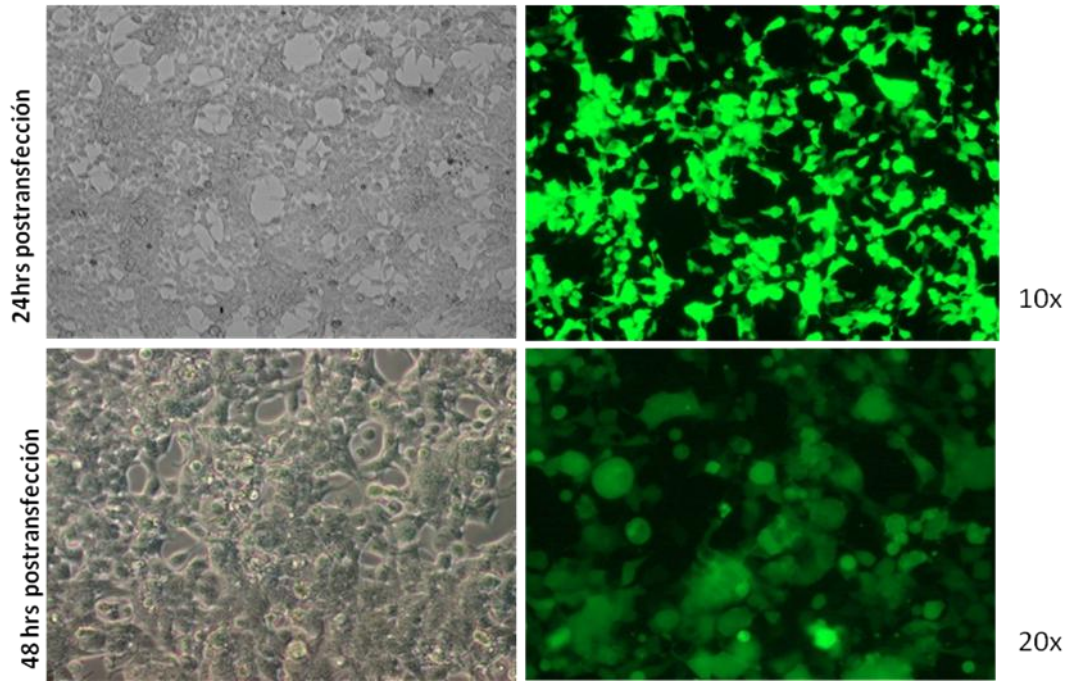


Figura 20. Eficiencia de transfección del vector pLVX-miR-138, en las células HEK293T. A las 24 hrs postransfección se observa una eficiencia del 80% al igual que a las 48 %.

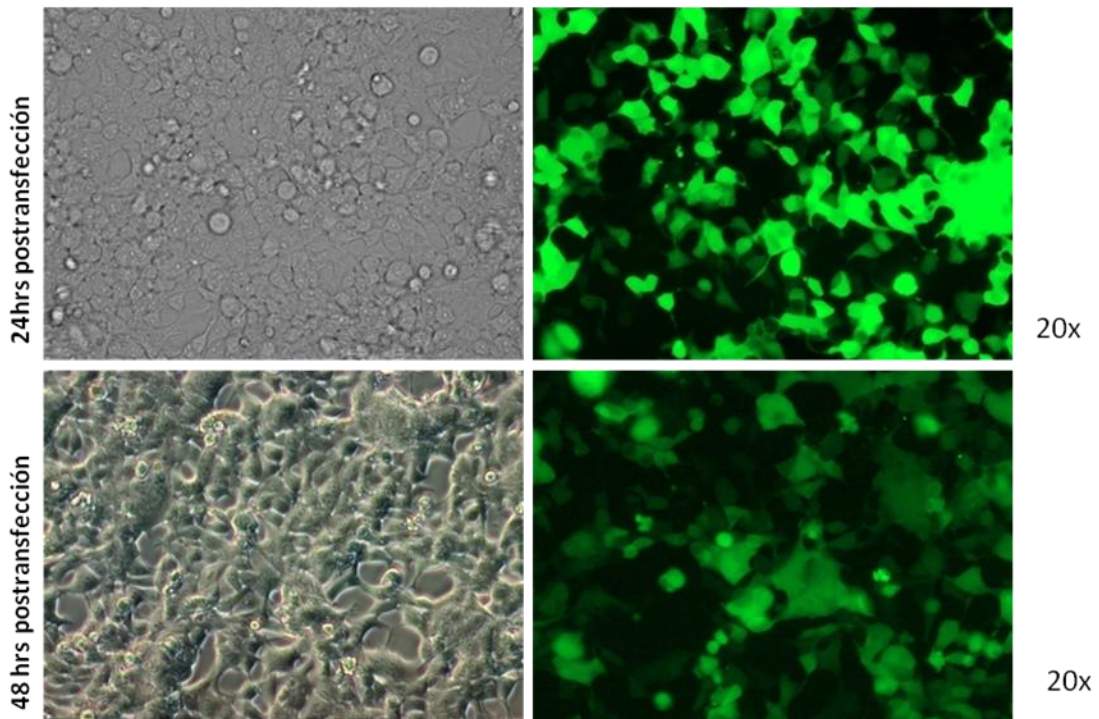


Figura 21. Eficiencia de transfección del vector pLVX-scramble en las células HEK293T. A las 24 hrs postransfección se observa una eficiencia del 80% al igual que a las 48 %.

Después de coleccionar los sobrenadantes donde se encontraban los viriones, se realizó una prueba para la detección de la proteína p24 de la cápside viral (GoStix). La prueba es positiva cuando el número de Unidades Infecciosas por mililitro (IFU/ml) es mayor a 5×10^5 . Como se puede ver en la figura 22, con ambos sobrenadantes (pLVX-scramble y pLVX-miR-138), la prueba resultó negativa, lo que sugiere que no se obtuvo un adecuado título viral, al menos el mínimo requerido para las transducciones. Para que una prueba se positiva (+) se debe teñir dos bandas una correspondiente al control y otra al sobrenadante viral de interés (figura 9).

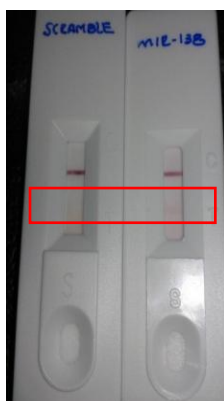


Figura 22. Prueba GoStix en los sobrenadantes pLVX-scramble y pLVX-miR-138 para observar la producción de unidades infecciosas por ml (partículas virales). La prueba es negativa cuando solo se tiñe la banda control (C).

Al realizar un segundo empaquetamiento viral, cambiando el medio a las 4 h posttransfección, no se observó algún cambio en la eficiencia de transfección (figuras 23). Sin embargo, al realizar la prueba GoStix, esta resultó positiva indicando que se tenía más de 5×10^5 IFU/ml de partículas virales (figura 24). La banda teñida no fue tan intensa como la del control, lo que sugería un título viral \geq a 5×10^5 IFU/ml, pero posiblemente no suficiente para las transducciones.

En un intento por evaluar la funcionalidad de las partículas virales obtenidas, se decidió transducir las células adherentes AD-293 y células leucémicas CCRF, las cuales crecen en suspensión. Ambas líneas celulares presentaron una eficiencia de transducción menor al 10%. En el caso de las células CCRF la eficiencia es menor que en las adherentes, esto se atribuye a que hay baja producción de viriones, que no permiten tener una mayor eficiencia de transducción (Figura 25). Se propone cultivar las células con otra marca de suero que sea libre de tetraciclina, debido a que este sistema es inducible en la presencia del antibiótico, es decir, la transcripción puede ser disminuída o aumentada en función de la dosis de tetraciclina empleada, este sistema recibe el nombre Tet-on.

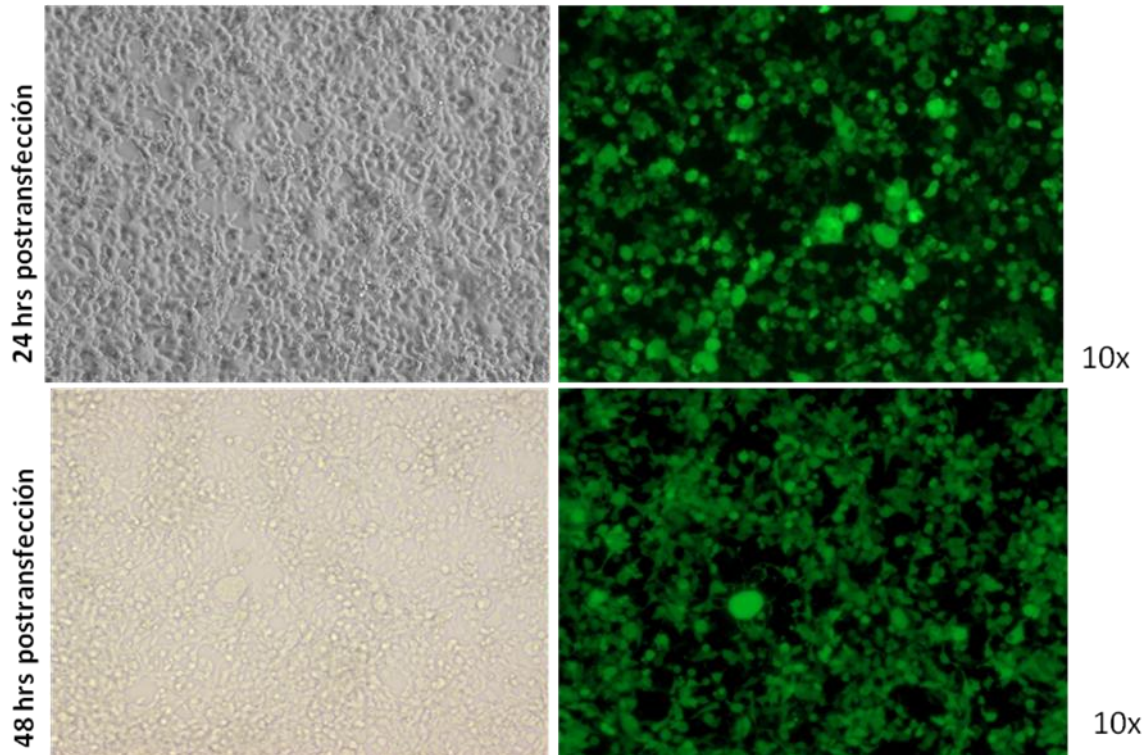


Figura 23. Transfección del vector *pLVX-miR-138* en las células *HEK293T*. A las 24 hrs posttransfección se observa una eficiencia del 80% al igual que a las 48 %.



Figura 24. Prueba GoStix del sobrenadante de *pLVX-miR-138* para estimar la producción de unidades infecciosas por ml (partículas virales). La prueba es negativa cuando solo se tiñe la banda control (C).

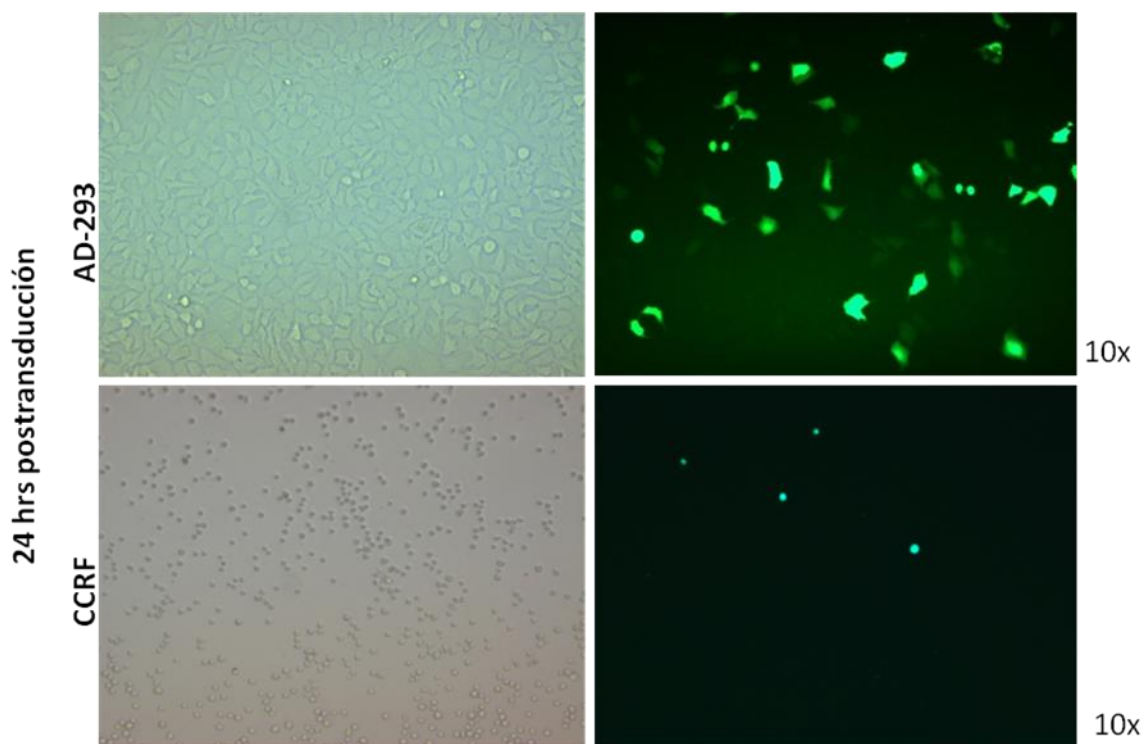


Figura 25. Células AD-293 y CCRF transducidas con los lentivirus que expresan miR-138. A las 24 hrs postransducción se observa una eficiencia del 10% tanto en células AD-293 y CCRF.

Decidimos realizar los ensayos posteriores en células AD-293, debido a que la producción de partículas virales para transducir las células CCRF no fue exitosa, después de varios intentos. Las células AD-293 fue el modelo utilizado en mi tesis de licenciatura⁴², las cuales son células muy fáciles de transfectar, donde se obtiene una eficiencia de transfección arriba del 80%. Es importante recalcar que las células AD-293 no tienen una expresión endógena de miR-223 (corroborado por RT-PCR tiempo real en mi tesis de licenciatura), por lo que es necesario transfectarlas con un plásmido que expresa este miR-223 (pLVX-miR-223 generado anteriormente⁴²) para los siguientes experimentos.

14.5 MiR-223 disminuye los niveles de la proteína gp-170.

Como se menciono anteriormente las células AD-293 no expresan miR-223, por lo que se transfectó el plásmido recombinante (pLVX-miR-223) que en estudios previos de mi licenciatura mediante RT-PCR en tiempo real fue corroborado su sobre-expresión⁴². 24 h postransfección, se realizaron los ensayos de citometría de flujo permeabilizando las células. Como puede verse en la figura 26, hay una disminución significativa de Pgp-170 cuando miR-223 está presente ($p < 0.05$).

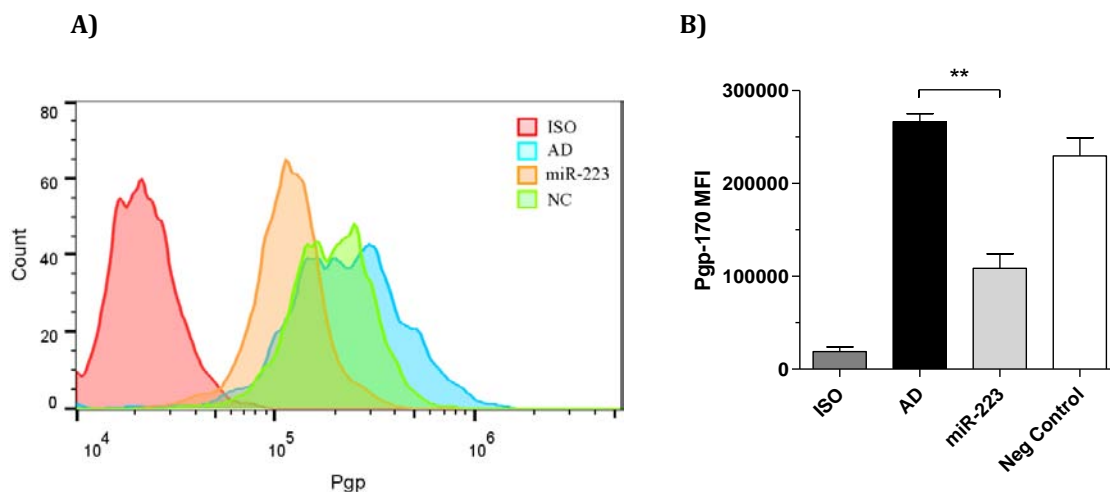


Figura 26. Modulación de la expresión de Pgp-170 en células AD-293 mediante miR-223. A) Histograma de la modulación de la proteína gp-170; el control de isotipo (rojo), células sin transfectar (azul), células AD-293 transfectadas con miR-223 (naranja) y células transfectadas con el control negativo (verde), B) Gráfica de la Intensidad de Fluorescencia Media de los diferentes tratamientos; ISO: control de isotipo, AD: células AD-293 sin tratamientos, miR-223: células AD-293 transfectadas con miR-223 y Neg Control: células transfectadas con el control negativo. El análisis fue realizado con 10,000 células viables. (* p < 0.05).

14.6 Evaluación de la funcionalidad de Pgp-170 mediante ensayos de eflujo de rodamina 123 con y sin la expresión por miR-223.

Para evaluar la funcionalidad de la proteína gp-170, se realizaron ensayos de eflujo de rodamina 123 (Sigma), un sustrato conocido de la bomba gp-170, en las células con y sin expresión de miR-223. Para la estandarización de la expulsión de rodamina, inicialmente se realizó una curva de concentración con 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1 µg/mL⁴³. De manera interesante se observó que estas concentraciones de este compuesto son tóxicas para las células AD-293 (figura 27 se muestran ensayos representativos). La viabilidad se determinó con 7-AAD (BD), el cual excluye a las células muertas de las vivas.

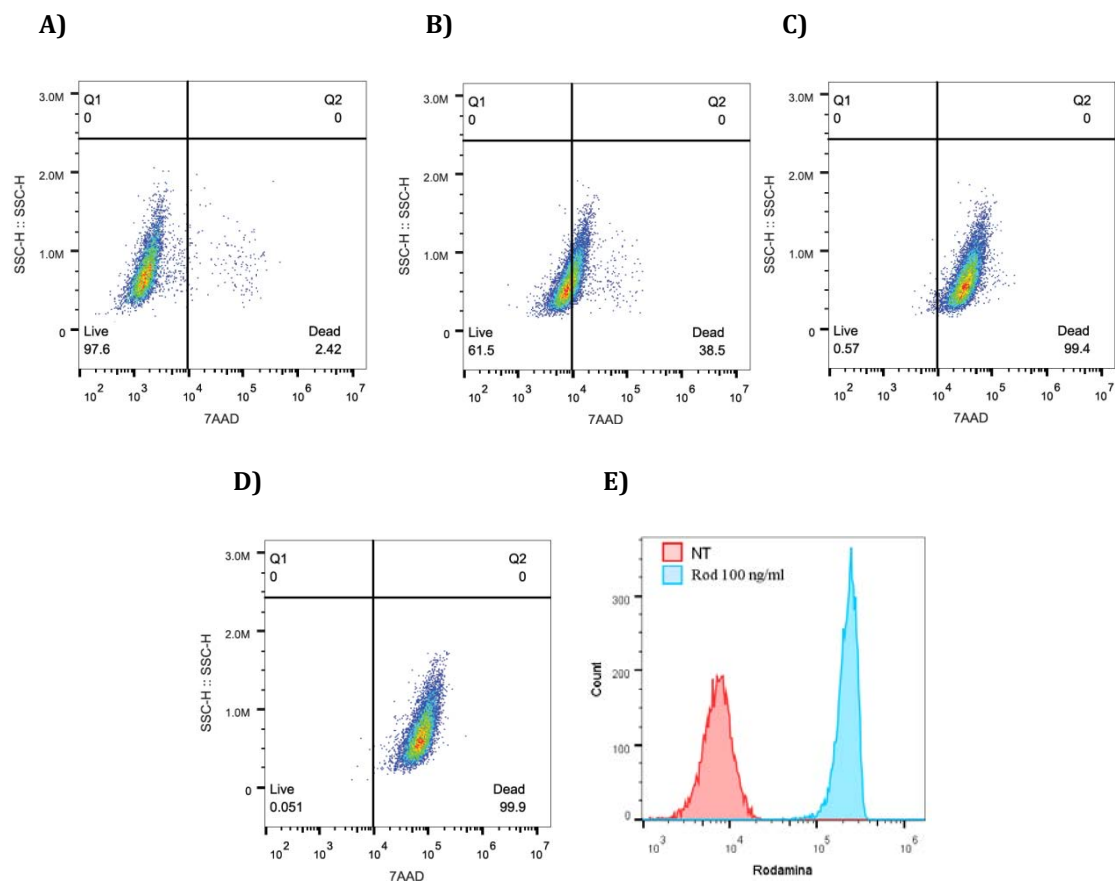


Figura 27. Viabilidad de las células AD-293, tratadas a diferentes concentraciones con Rodamina 123 (Rod). Las células fueron tratadas con Rod durante 10 min y después de una incubación de 1hr, sin el colorante, las células se tiñeron con 7AAD durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. A) Células no tratadas (NT), con un porcentaje de 97.6% de células vivas; B) Células incubadas con 100 ng/ml rodamina, con un porcentaje de 61.5 % de células vivas; C) Células incubadas con 500 ng/ml rodamina, con un porcentaje de 99.4% de células muertas; D) Células incubadas con 1 µg/ml rodamina, con un porcentaje de 99.9 % células muertas; E) Histograma del desplazamiento de la fluorescencia de Rod con una concentración de 100 ng/ml (azul), con respecto a las células NT (rojo). El análisis fue realizado con 10 000 células.

Lo anterior conllevó a una disminución de la concentración de rodamina 123 a 10 y 50 ng/mL y posteriormente se evaluó la viabilidad y expulsión de rodamina. En la figura 28, podemos observar que estas concentraciones de rodamina ya no resultan tóxicas para las células (figuras 28-A y 28-B) y que la intensidad de fluorescencia con un mayor rango de desplazamiento, ocurre con 50 ng/mL, por lo que esta concentración fue elegida para los tratamientos posteriores (figura 28-C).

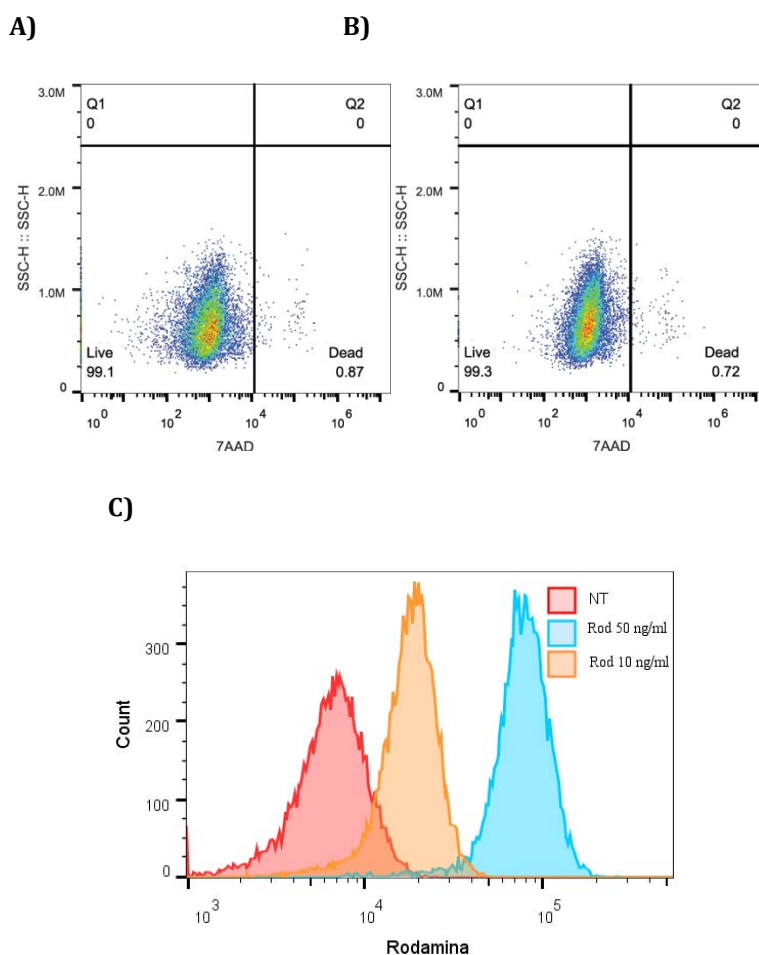


Figura 28. Viabilidad y expulsión de rodamina 123 (Rod) en células AD-293. Las células fueron tratadas con Rod 123 durante 10 min y después de una incubación de 1hr, sin el colorante, las células se tiñeron con 7AAD durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. A) Células tratadas con 10 ng/ml de Rod; B) Células tratadas con 50 ng/ml de Rod; C) Histogramas de fluorescencia de Rod a diferentes concentraciones, NT: rojo; Rod 50ng/ml: azul; Rod 10 ng/ml: naranja. El análisis fue realizado con 10 000 células viables.

De la misma manera se realizó una curva de concentración para el inhibidor de la bomba gp-170 Ciclosporina A (CsA) (Novartis®), con concentraciones de 0.5 μ M, 0.1 μ M y 10 nM. En la figura 29-A, se puede observar que con la concentración de 10 nM se tiene una viabilidad del 98.8% En las otras dos concentraciones, el porcentaje de células muertas es alto (figuras 29-B y 29-C).

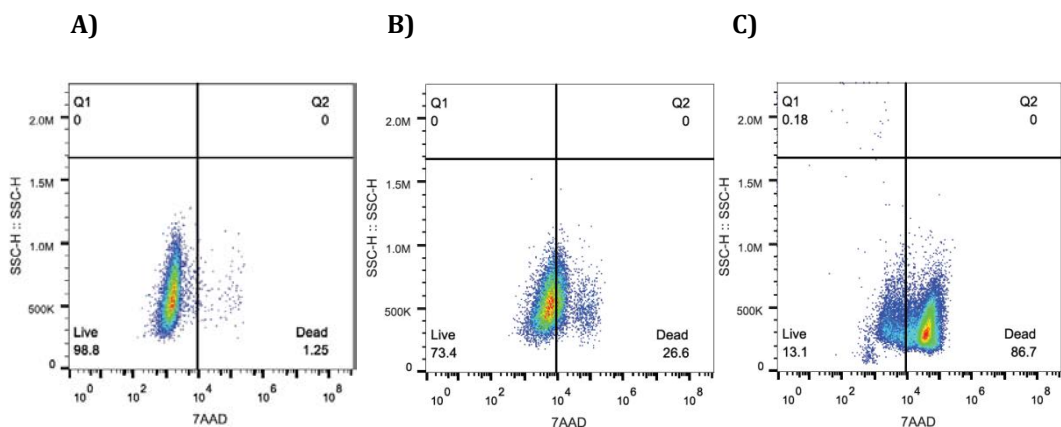


Figura 29. Viabilidad de las células AD-293 tratadas a diferentes dosis de Ciclosporina A (CsA). Las células AD-293 fueron tratadas con CsA durante 10 min y después de una incubación de 1hr, sin el fármaco, las células se tiñeron con 7AAD durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. A) Células tratadas con 10 nM de CsA; B) Células tratadas con 0.1 μM B) y 0.5 μM de CsA C), respectivamente. El análisis fue realizado con 10 000 células.

Después de haber seleccionado los parámetros óptimos del ensayo de eflujo (figura 29), se observa que el fármaco comercial CsA no produce un efecto inhibitorio significativo con respecto a las células que son solo tratadas con Rod (figura 30-A y 30-B, histograma naranja), tanto con la concentración de rodamina 10 ng/ml (A) y 50 ng/ml (B). Estos histogramas son representativos de tres experimentos independientes.

Para corroborar si había una expulsión de Rod después de una incubación de 1 hr, se incluyó un control, el cual consistía en medir la rodamina inicial (Rod i) después de 10 min de incubación, el cual sería la máxima intensidad de fluorescencia media de rodamina que captan las células. En la figura 30-C, podemos observar la expulsión de Rod, en donde el histograma de Rod i (azul), se observa una mayor retención de rodamina que en los histogramas de rodamina final (Rod f: naranja) y rodamina + CsA (verde). Estos dos últimos adquiridos después de una hora, lo que denota que en el lapso de una hora si hay expulsión de rodamina 123. Además sugiere que CsA no inhibe Pgp-170 a la concentración de 10 nM. Con base en estos resultados, se decidió cambiar el inhibidor CsA por Verapamil (Ver) (Kener®).

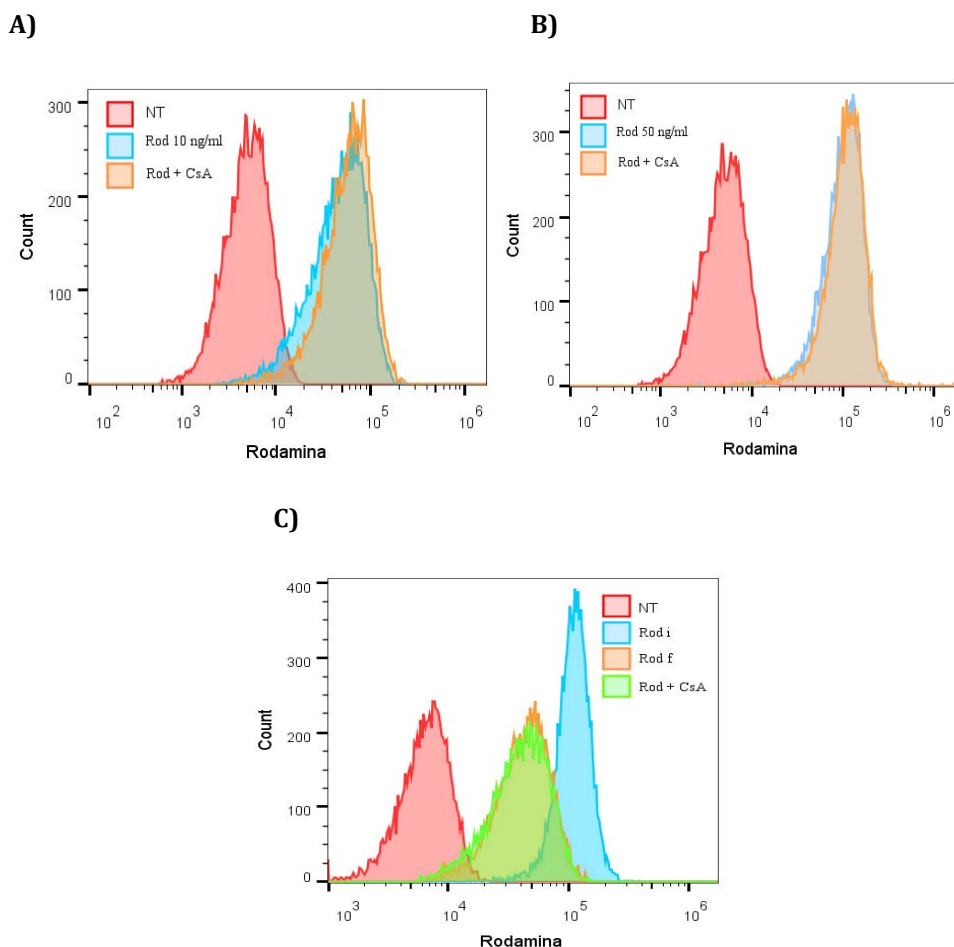


Figura 30. Efecto de la CsA en la inhibición de la bomba gp-170. Las células fueron tratadas con CsA 10 nM y/o Rod durante 10 min y posteriormente se incubaron 1 hr sin el colorante. Posteriormente las células se tiñeron con 7AAD durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. A) Histograma de la retención de Rod 123 a una concentración de 10 ng/ml 10 nM de CsA; B) Histograma representando la retención de Rod 123 a una concentración de 50 ng/ml y 10nM de CsA; C) Expulsión de Rodamina 123. No tratadas (NT: rojo), Rodamina inicial o acumulación de rodamina (Rod i: azul), Rodamina final o expulsión de rodamina (Rod f: naranja), inhibición de Pgp-170 (Rod + CsA: verde). El análisis fue realizado con 10 000 células viables.

Se siguió el mismo protocolo que para CsA, realizando una curva de concentración con Ver, determinando que las concentraciones de 0.01 μM , 0.1 μM y 1 μM no eran tóxicas para las células AD-293. En el ensayo de eflujo de rodamina (figura 30), no se observa una inhibición a las diferentes concentraciones utilizadas de Ver, también se aprecia que a concentraciones menores (0.01 μM y 0.1 μM) el inhibidor no tuvo efecto (Rod + Ver: verde), comportándose como las células no tratadas (NT: rojo).

Debido a que los inhibidores de la bomba gp-170 con los que se contaba no ejercían un efecto, se decidió probar si con el miRNA se podía observar una inhibición. Haciendo un análisis de las condiciones experimentales, se encontró que rodamina 123 es un colorante que se excita a 488 nm y emite desde 515-575 nm, por lo que en la configuración del citómetro

utilizado (BD Accuri C6), se colecta en el filtro 530/30, con el cual también se detecta FITC y proteína verde fluorescente (GFP). Lo anterior representó una limitante debido a que nuestro plásmido pLVX-miR-223 expresa la proteína verde fluorescente (ZsGreen), causando un traslape en la señal. Como una alternativa, se decidió transfectar un mimic de miR-223 comercial que no fluoresce (Ambion), a una concentración sugerida de 10 nM y un control negativo comercial para miRNAs, que no tiene especificidad por alguna secuencia en humanos (*GE, Dharmacon*).

Sin embargo, los resultados obtenidos en la figura 31, muestran que la retención de Rod para las células tratadas con el mimic miR-223 no es significativo comparado con el control negativo utilizado. Este es un histograma representativo de 3 experimentos independientes.

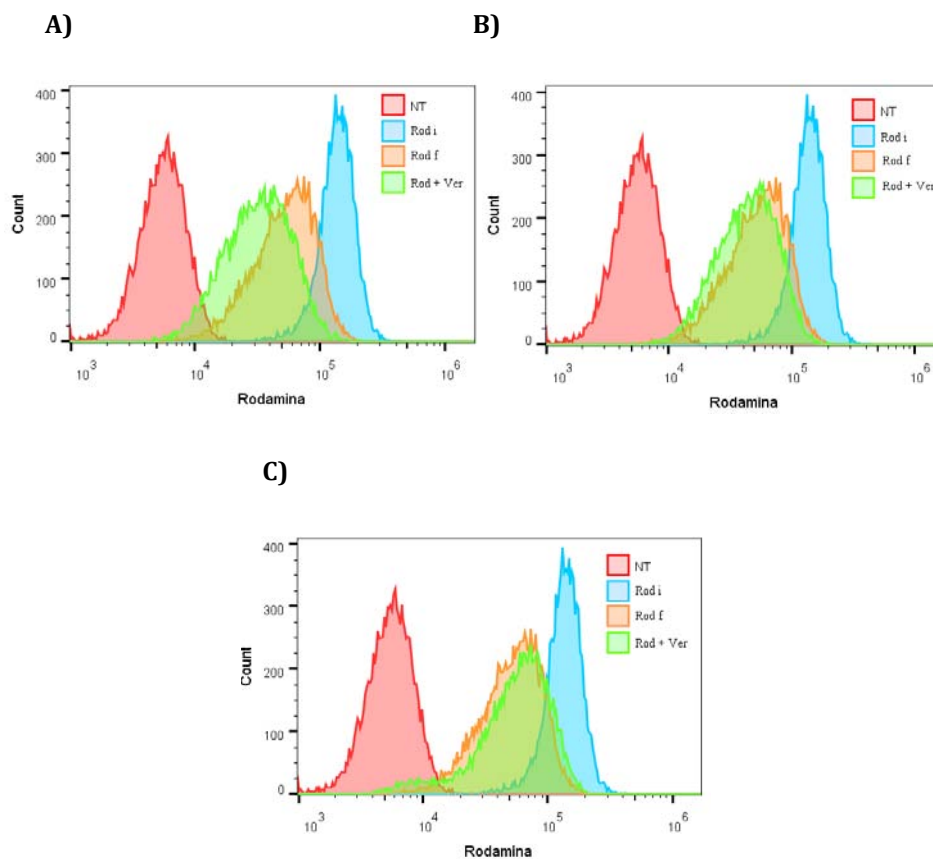


Figura 31. Inhibición de la bomba *gp-170* mediante Verapamil (Ver). Las células fueron tratadas con Ver y/o Rod 50 ng/ml durante 10 min, se incubaron 1 hr sin el colorante, posteriormente las células se tiñeron con 7AAD durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. A) Células tratadas con Ver 0.01 μ M B) Ver 0.1 μ M y C) Ver 1 μ M. No tratadas (NT: rojo), Rodamina inicial (Rod i: azul), Rodamina final (Rod f: naranja), inhibición de Pgp-170 (Rod + Ver: verde). El análisis fue realizado con 10 000 células viables.

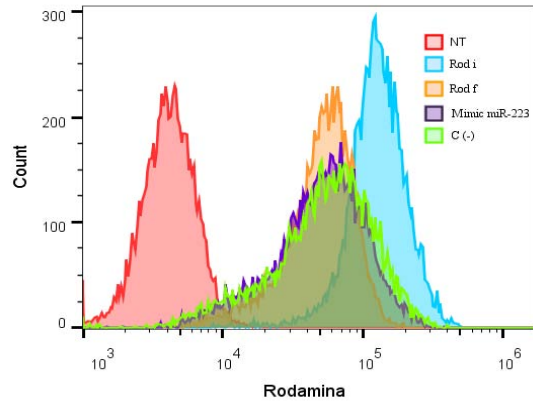


Figura 32. Efecto de miR-223 sobre la bomba *gp-170* en células *AD-293*. Las células fueron transfectadas con 10 nM del mimic de miR-223 (Mimic miR-223) y 10 nM del control negativo [C(-)]. 24 hrs postransfección, las células fueron tratadas con Rod 50 ng/ml durante 10 min (Rod i), se incubaron 1 hr sin el colorante (Rod f) y posteriormente las células se tiñeron con 7AAD durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. El análisis fue realizado con 10 000 células viables.

15. DISCUSIÓN

El aumento de producción de Pgp-170 contribuye a la resistencia a múltiples fármacos (MDR), fenotipo que se encuentra en muchas células cancerosas. Pgp-170 se ha identificado como un blanco molecular, para encontrar terapias exitosas que contrarresten su función como una bomba expulsora de fármacos. En la actualidad se ha demostrado que su expresión es regulada, por los miRNAs, los pequeños RNAs endógenos de 21-23 nt que regulan de manera postranscripcional la expresión génica de MDR1. De manera directa por complementariedad con la región UTR-3' del mRNA de *MDR1* o de manera indirecta uniéndose a otro mRNA que codifica para proteínas intermediarias o factores de transcripción involucrados en la activación del gen MDR1⁴⁵.

Por ejemplo, miR-451 regula la expresión de Pgp a través de un sitio de unión único dentro UTR-3' de *MDR-1*, observado en células de cáncer de mama resistentes a doxorubicina (MCF-7 / DOX), que al aumentar los niveles celulares de miR-451 hay una disminución en la expresión de la proteína gp-170 y un aumento en la sensibilidad celular a doxorubicina⁴⁶. También se ha descrito miR-331-5p en células K562 resistentes a doxorubicina, en donde la sobreexpresión de miR-331-5p aumenta la sensibilidad de las células K562 resistentes a doxorubicina, a través de la inhibición de la MDR-1 de expresión génica por el miRNA⁴⁰.

Previamente en nuestro grupo de investigación se realizó un ensayo *in silico* (*microrna.org*) que sugería un sitio de unión para miR-223 en el mRNA de *MDR1*, que posteriormente mediante ensayos reporteros de luciferasa se corroboró la interacción directa entre el UTR-3' de *MDR1* y miR-223. Por lo anterior, en el presente trabajo se propuso que la regulación directa del Pgp-170 a través de miR-223 disminuiría los niveles de la proteína Pgp-170 y por consiguiente restablecerá la quimiosensibilidad en células LLA pediátricas⁴³.

Inicialmente se evaluó la expresión de miR-223 por RT-PCR en tiempo real en células de LLA pediátrica CCRF y células CEM/C2, estas últimas con una mutación en la topoisomerasa I confiriéndole resistencia a múltiples fármacos. Se observó que hay una expresión endógena de miR-223, por lo que se tomó la estrategia de generar antagómiros capaces de secuestrar a miR-223 y observar la modulación de su blanco (Pgp-170).

El siguiente objetivo era transfectar los antagómiros para miR-223 en las células CCRF en suspensión, pero en este tipo de células la eficiencia de transfección es baja (10%) por métodos lipofílicos (Lipofectamina 2000; Life Technologies) o electroporación (ECM 2001 (BTX)), dado que para observar un cambio significativo en la expresión de miR-223 es necesario obtener una eficiencia de 70-80%. El tener eficiencias mayores se logra con sistemas lentivirales, por lo que se comenzó la estandarización utilizando el sistema comercial "Lenti-X shRNA Expression System" (Clontech), este sistema consiste en la generación de lentiviruses VSV-G, a partir de vectores lentivirales basados en VIH-1. Los antagómiros generados poseen las características necesarias para ser empaquetados por este sistema (pLVX-anti-miR-223 y pLVX-anti-miR-223 tándem). Sin embargo, la producción de partículas

virales no fue exitosa, las razones por las cuales no hubo una producción suficiente de viriones pueden ser por que: a) no hubo un cambio de medio después de 4 hrs postransfección como lo sugiere el protocolo del kit, b) porque el suero del medio donde crecen las células HEK293T no es libre de tetraciclina, ya que trazas de tetraciclina afectan a las proteínas de empaquetamiento vírico dando como resultado títulos virales bajos, además de ser un sistema Tet-On en donde la transcripción puede ser disminuía o aumentada en función de la dosis de tetraciclina⁴⁸.

Los experimentos se continuaron en las células AD-293 donde se evaluó la expresión de la proteína Pgp-170, con la estrategia de permeabilización de las células, debido a que no se observó una expresión abundante en la superficie celular y se encuentra reportado que también está presente en organelos como lisosomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico²⁵.

Posteriormente para conocer que miR-223 modulaba la expresión de Pgp-170, las células AD-293 fueron transfectadas con miR-223 y 24 h postransfección se evaluó por citometría de flujo la expresión de la proteína, se observó una disminución significativa de la proteína gp-170 cuando hay una sobre-expresión de miR-223 ($p < 0.05$), corroborando que miR-223 es capaz de inhibir la expresión de Pgp-170.

La funcionalidad de la proteína gp-170 se evaluó mediante ensayos de eflujo de rodamina 123, un sustrato conocido de la bomba gp-170, en las células con y sin expresión de miR-223. Inicialmente se buscaron controles positivos de inhibición como Verapamil (Kener) y Ciclosporina A (Novartis), pero no ejercían un efecto, buscando en las compañías que producen reactivos grado biología molecular (Sigma), se encontró que existen diferentes enantímeros para estos compuestos con funciones diferentes, y que en algunos casos mezclas racémicas son las selectivas para bombas expulsoras de fármacos, por lo que la adquisición de estos reactivos es fundamental para ver un efecto inhibitorio, ya que los de uso clínico con lo que se contaba no son específicos para la inhibición de Pgp-170. Debido a que los inhibidores de la bomba gp-170 con los que se contaba no ejercían un efecto, se decidió probar si con el miRNA se podía observar una inhibición.

Haciendo un análisis de las condiciones experimentales, se encontró que rodamina 123 es un colorante que se excita a 488 nm y emite desde 515-575 nm, por lo que en la configuración del citómetro utilizado (BD Accuri C6), se colecta en el filtro 530/30, con el cual también se lee FITC y GFP (figura 33). Lo anterior representó una limitante debido a que nuestro plásmido pLVX-miR-223 expresa la proteína verde fluorescente (ZsGreen), causando un traslape en la señal. Como una alternativa, se decidió transfectar un mimic de miR-223 comercial que no fluoresce (Ambion), a una concentración de 10 nM y un control negativo comercial para miRNAs, que no tiene especificidad por alguna secuencia en humanos (*GE, Dharmacon*). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la retención de Rod para las células tratadas con el mimic miR-223 no es significativo comparado con el control negativo utilizado. Esto puede deberse a que el mimic de miR-223 utilizado se transfecta con una concentración

limitante (10 nM), y las moléculas de miR-223 que llegan al blanco no son suficientes para visualizar un efecto significativo, en comparación con el plásmido construido que genera mayor cantidad de precursores del miRNA, además de que la conformación lineal de un oligonucleótido de doble cadena es más lábil, que la de un plásmido circular covalentemente cerrado, es decir, las moléculas del mimic de miR-223 tienen una vida media más corta por lo que no pueden ser utilizados para experimentos a largo plazo. Comercialmente los mimics disponibles son generalmente costosos y a menudo diseñados para favorecer la expresión de la hebra de miARN mediante la manipulación de la secuencia de la hebra de miARN* (* hebra guía), esto los hace inadecuados para las investigaciones relativas a la función de las especies miARNs. Sistemas de expresión de miARN basados en vectores pueden ser utilizados para asegurar la expresión estable de miRNAs⁴⁹. Por lo anterior se propone que para poder utilizar el plásmido que contiene ZsGreen, es necesario cambiar el sustrato de la bomba gp-170, para evitar un traslape con la fluorescencia como Rodamina Red o Rho-5N (figura 34), pero en la literatura no están reportados estos sustratos para el ensayo de eflujo, por lo que sería necesario estandarizar la técnica para evaluar si son buenos candidatos para observar un efecto de eflujo.

16. CONCLUSION.

Los experimentos sugieren fuertemente que miR-223 disminuye los niveles de expresión en la proteína gp-170 en células AD-293.

17. PERSPECTIVAS.

- Continuar con la estandarización de empaquetamiento viral, para transducir las células CCRF con el antagonista de miR-223, con la finalidad de observar el cambio en la expresión de Pgp-170 por efecto de miR-223 en este modelo celular.
- Evaluar la muerte celular por apoptosis mediante la determinación de caspasas, en las células con y sin expresión de miR-223.

18. ANEXOS

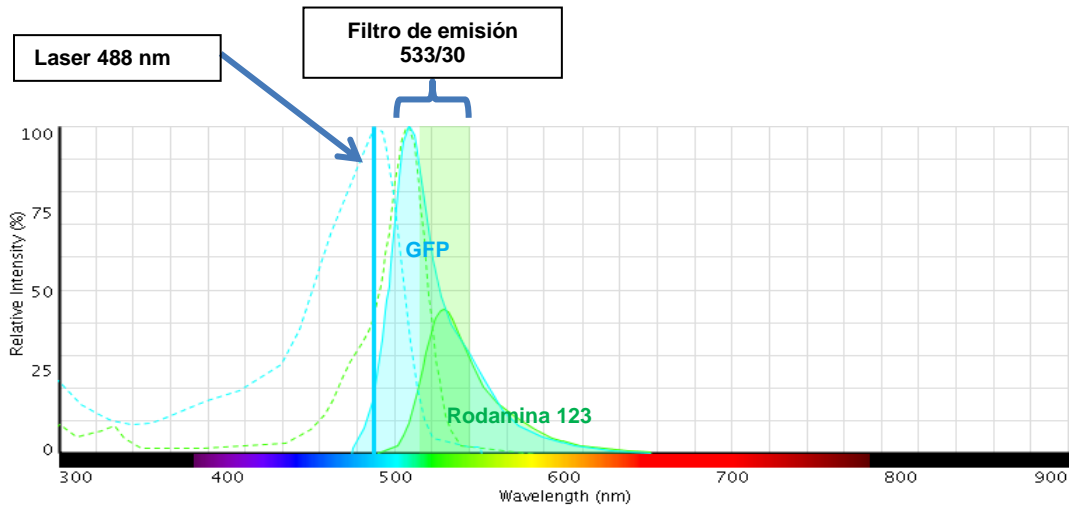


Figura 32. Espectro de emisión de GFP y Rodamina 123. GFP: histograma en azul, Rodamina 123: histograma verde.

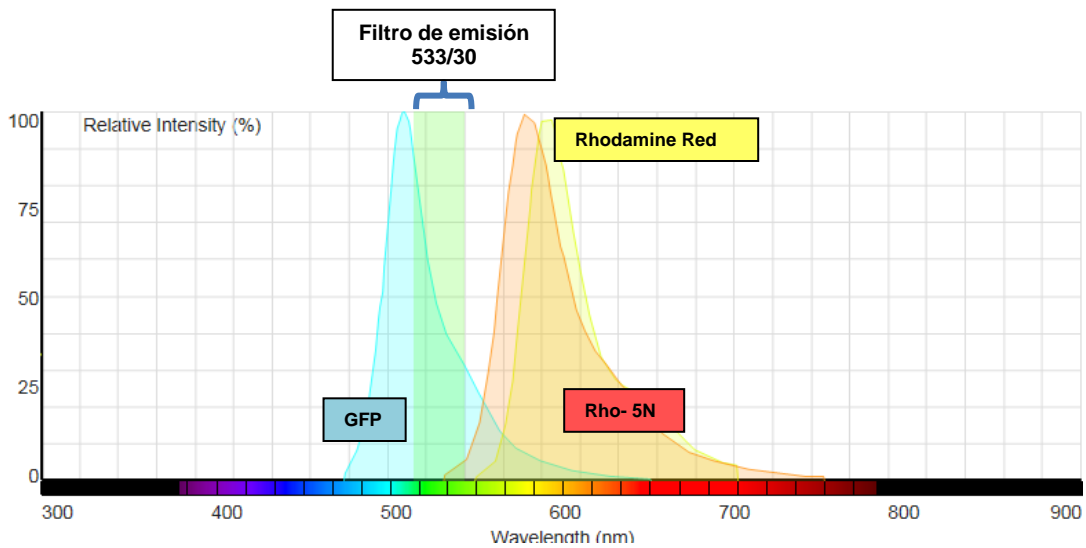


Figura 33. Espectro de emisión de GFP y posibles sustratos de Pgp-170 para el ensayo de eflujo. GFP: histograma en azul, Rhodamine Red: histograma amarillo y Rho-5N: histograma rojo.

19. LITERATURA CITADA

- 1 Aquino-Jarquín G. Pequeños gigantes en el mundo del ARN. *Innovación y ciencia* 2007; 14: 38-45.
- 2 He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev Genet.* 2004; 5: 522-31.
- 3 Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 509-24.
- 4 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.
- 5 Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.
- 6 Sun W, Julie Li YS, Huang HD, Shyy JY, Chien S. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed. Eng* 2010; 12: 1-27.
- 7 Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol* 2011; 51: 25-43.
- 8 Sheng Q, Ping Jin, Xue Z. The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human. *Plos one* 2015; 10(6).
- 9 Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 475-88.
- 10 Iwakawa HO, Tomari Y. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell* 2013; 52: 591-601.
- 11 Park JH, Shin C. MicroRNA-directed cleavage of targets: mechanism and experimental approaches. *BMB. Rep.* 2014; 47: 417-23.
- 12 Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 2004; 18: 504-11.
- 13 Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA.* 2007; 13: 1894-910.
- 14 Kuhn CD, Joshua-Tor L. Eukaryotic Argonautes come into focus. *Trends Biochem. Sci* 2013; 38: 263-71.
- 15 Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e179.
- 16 Bai H, Xu R, Cao Z, Wei D, Wang C. Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line. *FEBS Lett* 2011; 585: 402-8.
- 17 Zhang H, Li M, Han Y *et al.* Down-regulation of miR-27a might reverse multidrug resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *Dig. Dis Sci* 2010; 55: 2545-51.
- 18 Sánchez-Suárez P, Benítez-Bibriesca L. Procesos biomoleculares de la resistencia a drogas. *Cancerología* 2006; 1: 187-99.
- 19 Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323: 466-83.
- 20 Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152-62.

- 21 Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 1983; 221: 1285-8.
- 22 Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR *et al.* The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8822-6.
- 23 Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 2011; 50: 161-78.
- 24 Ueda K. ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011; 75: 401-9.
- 25 Fu D. Where is it and How Does it Get There - Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein. *Front Oncol.* 2013; 3: 321.
- 26 Kodan A, Yamaguchi T, Nakatsu T *et al.* Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 4049-54.
- 27 Haber DA. Multidrug resistance (MDR 1) in leukemia: is it time to test? *Blood* 1992; 79: 295-8.
- 28 Eckford PD, Sharom FJ. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 2009; 109: 2989-3011.
- 29 Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev* 1990; 42: 155-99.
- 30 Wang D, Ke XY, Wang J, Xu F, Hu YF. [Correlation between MDR1 genetic polymorphism and prognosis in acute myeloid leukemia]. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* 2007; 87: 1384-8.
- 31 Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 265-9.
- 32 Goldstein LJ, Galski H, Fojo A *et al.* Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81: 116-24.
- 33 Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N. Engl. J Med* 1987; 316: 1388-93.
- 34 Li Z, Hu S, Wang J *et al.* MiR-27a modulates MDR1/P-glycoprotein expression by targeting HIPK2 in human ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 2010; 119: 125-30.
- 35 Tsang TY, Tang WY, Chan JY *et al.* P-glycoprotein enhances radiation-induced apoptotic cell death through the regulation of miR-16 and Bcl-2 expressions in hepatocellular carcinoma cells. *Apoptosis.* 2011; 16: 524-35.
- 36 Yamamoto Y, Yoshioka Y, Minoura K *et al.* An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells. *Mol Cancer* 2011; 10: 135.
- 37 Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL *et al.* A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat. Genet.* 2011; 43: 673-8.
- 38 Zhu YD, Wang L, Sun C *et al.* Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Med Oncol.* 2012; 29: 2323-31.
- 39 Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern. Med* 2013; 274: 215-26.

- 40 Feng DD, Zhang H, Zhang P *et al.* Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 2164-75.
- 41 Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. *Mol Pharmacol.* 2013; 83: 399-405.
- 42 Fazi F, Rosa A, Fatica A *et al.* A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005; 123: 819-31.
- 43 López-Castillejos ES. Regulación postranscripcional del gen MDR1/Pgp-170 a través de miR-223. UNAM FES Cuautitlán, 2013.
- 44 Twentyman PR, Rhodes T, Rayner S. A comparison of rhodamine 123 accumulation and efflux in cells with P-glycoprotein-mediated and MRP-associated multidrug resistance phenotypes. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1360-9.
- 45 Lopes-Rodrigues V, Seca H, Sousa D, Sousa E, Lima RT, Vasconcelos MH. The network of P-glycoprotein and microRNAs interactions. *Int J Cancer* 2014; 135: 253-63.
- 46 Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J *et al.* Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 2152-9.
- 47 Velu CS, Grimes HL. Utilizing antagomiR (antisense microRNA) to knock down microRNA in murine bone marrow cells. *Methods Mol Biol* 2012; 928: 185-95.
- 48 Castillo-Ureta H, Barrera-Saldana HA, Martinez-Rodriguez HG. [A tetracycline-inducible gene system allows for regulated production of proteins with therapeutic potential]. *Rev Invest Clin* 2004; 56: 748-55.
- 49 Qu B, Han X, Tang Y, Shen N. A novel vector-based method for exclusive overexpression of star-form microRNAs. *PLoS One* 2012; 7: e41504.
- 50 Zhou H, and Rigoutsos I. MiR-103a-3p targets the 5'-UTR of GPRC5A in pancreatic cells. *RNA.* 2014. 20(9).
- 51 Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Vemuganti R. 2013. MicroRNA miR- 324-3p Induces Promoter-Mediated Expression of RelA Gene. *Plos One.* 8(9): e79477.
- 52 Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier HA. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci.* 2008.105: 14879-14884.