



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL MIR-7 (MICRORNA-7) EN
LINFOMAS NO HODGKIN Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TIPO KRÜPPEL 4 (KLF4) Y DE
YY1; IMPLICACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARIO MORALES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO I. VEGA PAREDES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:
DRA. SARA HUERTA YEPEZ
FACULTAD DE MEDICINA
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2021



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.

Índice

1. Índice de figuras y tablas.....	4
2. Lista de abreviaturas	5
3. Abstract	7
4. Resumen	8
5. Marco Teórico.....	9
4.1 Cáncer	9
5.2 Linfoma	10
5.3 Linfoma No-Hodgkin	10
5.4 Fisiopatología de LNH.....	11
5.4.1 Linfoma difuso de células B grandes.	12
5.4.2 Linfoma folicular	13
5.4.3 Linfoma de Burkitt.....	14
5.5 Blancos terapéuticos y biomarcadores en LNH.....	14
5.5.1 Factor de Transcripción tipo Krüppel 4 (KLF4).....	16
5.5.2 KLF4 en malignidades	17
5.5.3 Factor de Transcripción YY1	20
5.6 miRNAs y cáncer	22
5.6.1 miRNAs como biomarcadores.	26
5.6.2 miR-7 en Cáncer	29
5.6.3 mir-7 en neoplasias hematológicas.....	31
6. Planteamiento del problema	32
7. Preguntas de investigación.....	33
8. Hipótesis.....	33
9. Objetivos	33
9.1 Objetivo General	33
9.2 Objetivos particulares.....	33
10. Materiales y métodos	34
11. Resultados	40
11.1 La expresión de miR-7 correlaciona de manera negativa con la expresión de KLF4 y YY1 en líneas celulares de LNH.	40
11.2 miR-7 regula negativamente la expresión de KLF4 y YY1 en líneas celulares de LNH.	43
11.3 MiR-7 juega un papel en la capacidad de migración y quimioresistencia en líneas celulares de LNH.	45

11.4	La expresión de miR-7 correlaciona de manera negativa con la expresión de KLF4 y YY1 en biopsias de pacientes con LNH.....	48
11.5	La expresión de miR-7 se encuentra disminuida en tejidos de LNH... ..	50
12.	Discusión de Resultados	52
13.	Conclusiones.....	57
14.	Productos obtenidos.....	58
15.	Agradecimientos y financiamiento	60
16.	Referencias	61

1. Índice de figuras y tablas.

Figura 1. Biomarcadores reportados en subtipos de LNH.

Figura 2. Biogénesis de los miRNAs.

Figura 3. miRNAs y los sellos distintivos del cáncer.

Figura 4. Esquema de microarreglo de tejidos.

Tabla 1. miRNAs como potenciales biomarcadores.

Tabla 2. Blancos de miR-7 directos y sus funciones en diferentes tipos de cáncer.

Figura 5. Determinación de la expresión de miR-7, KLF4 y YY1, en líneas células de LNH.

Figura 6. miR-7 regula la expresión de KLF4 y YY1 mediante la unión a su región 3' UTR.

Figura 7. miR-7 juega un papel en la migración y la quimioresistencia en las líneas celulares de NHL.

Figura 8. Expresión de miR-7, KLF4 y YY1 en tejidos de LNH.

Figura 9. Correlación negativa de la expresión de miR-7 vs YY1 y KLF4 en tejidos de LNH.

Figura 10. La expresión de miR-7 está disminuida en tejidos de linfoma.

Figura 11. Representación esquemática del modelo propuesto del papel de miR-7 en la regulación del eje YY1/KLF4.

2. Lista de abreviaturas

BCR: Receptor de células B del inglés B-cell receptor.

CAGRs: Regiones genómicas asociadas a cáncer, del inglés cancer associated genomic regions.

CDDP: Cis-Diaminodicloroplatino (III)

cDNA: DNA complementario

CHOP: Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona.

CODOX-M-IVAC: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina-metrotrexato-etopósido, ifosfamida, y citarabina.

CVAD: ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metrotrexato y citarabina.

DLBCL : Del inglés : Diffuse Large B Cell Lymphoma. Linfoma difuso de células B grandes.

DLBCL-CG: DLBCL de centro germinal.

DLBCL-ABC: DLBCL de células B activadas.

DNA: Del inglés desoxirribonucleic acid, Acido desoxirribonucleico.

GC: Centro Germinal del inglés: Germinal Center.

IHQ: Inmunohistoquímica.

INH-miR-7: Inhibidor de miR-7.

IPI: Índice Pronóstico Internacional.

iPS: del inglés induced pluripotent stem, Células troncales pluripotentes.

LF: Linfoma Folicular.

LLC: Leucemia linfocítica crónica.

LNH: Linfoma No-Hodgkin.

MALT: del inglés Mucose Associated Lymphoma Tissue. Tejido linfático asociado a mucosas.

MAT: Microarreglo de tejidos.

MIM-miR-7: Mimetizador de miR-7.

miR-7: microRNA-7.

mRNA: RNA mensajero.

NK: del inglés Natural Killer, células asesinas naturales.

RT-PCR: PCR tiempo real.

SFB: Suero Fetal Bovino.

UTR: del inglés untranslated regions. Regiones no traducidas.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

3. Abstract

Non-Hodgkin lymphoma is a type of cancer that particularly affects the cells of the immune system. NHL is ranked in the 10th and 12th position in incidence and mortality, respectively. Despite current treatments, NHL patients have a survival rate nearly to 50%, for this reason more studies are required in order to understand their pathogenesis, which will offer new and better treatments. In this context, various studies have shown an important participation of proteins, transcription factors and recently microRNAs in the physiopathogenesis of NHL. In this work, the participation of miR-7 in NHL behavior was evaluated through the regulation of YY1 and KLF4, transcriptional factors directly involved in lymphomagenesis. The results showed that miR-7 is capable of regulate the expression of YY1 and KLF4 through direct binding to the 3'UTR region. Importantly, it was shown that the induced expression of miR-7 reverses resistance to chemotherapy and inhibits the migration capacity of NHL cell lines. Consistently, NHL tumor tissue analysis demonstrated a negative correlation of miR-7 expression versus YY1 and KLF4 expression. These results were corroborated based on the analysis of datasets from Oncomine database, in which the expression of miR-7 is related to overall survival, survival at three years and is differentially expressed in NHL compared to healthy tissue as control. Our results show for the first time that miR-7 participates in chemoresistance and migration through the negative regulation of YY1 and KLF4 in NHL cells lines. The obtained results allow us to propose the participation of the axis miR-7 / YY1 / KLF4 in NHL and propose as potential therapeutic targets.

4. Resumen

El cáncer es definido como un conjunto de enfermedades, cuya característica primordial presenta un desbalance entre la generación y muerte celular, en nuestro país, el cáncer es la tercera causa de muerte. Uno de los principales tipos de cáncer en México es el linfoma no-Hodgkin (LNH), el cual ocupa el sitio número 10 y 12 de incidencia y mortalidad respectivamente, este tipo de cáncer afecta inicialmente las células del sistema inmune. El LNH es caracterizado por signos y síntomas como sudores nocturnos, fiebre, cansancio, inflamación de ganglios linfáticos, entre otros, sin embargo, comparado con varias enfermedades de menor gravedad que presentan signos y síntomas similares, tales como influenza, estos suelen ser más recurrentes, siendo la biopsia de ganglio linfático la manera de confirmar la presencia del LNH. Los pacientes con LNH, tienen un porcentaje de supervivencia aproximado del 60% en adultos; por lo que más estudios son requeridos con el propósito de entender mejor su fisiopatogénesis, que nos permitirá ofrecerles nuevos y mejores tratamientos. En este contexto, diversos estudios han reportado la participación de proteínas, factores de transcripción y de manera reciente, de microRNAs en la fisiopatogénesis de LNH. En este trabajo se evaluó la participación del miR-7 en el comportamiento del LNH a través de la regulación de YY1 y KLF4, dos factores transcripcionales implicados en la promoción de linfomagénesis. Los resultados obtenidos muestran que miR-7 es capaz de regular la expresión de YY1 y KLF4, mediante la unión directa en la región 3'UTR. Esta regulación fue confirmada mediante la expresión inducida de miR-7, lo que resultó en la inhibición de la expresión constitutiva de YY1/KLF4, mientras que la inhibición de miR-7, correlacionó con un aumento en la expresión de YY1/KLF4. Experimentos adicionales demostraron que la expresión inducida de miR-7 revierte la resistencia a la quimioterapia e inhibe la capacidad de migración de las líneas celulares NHL-B. Adicionalmente, el análisis de tejidos tumorales provenientes de biopsias de pacientes diagnosticados con LNH, demostró que existe una correlación negativa de la expresión de miR-7 *versus* la expresión de YY1 y KLF4. Nuestros resultados muestran por primera vez que miR-7 tiene un papel en la quimio-resistencia y la migración de células de LNH a través de la regulación negativa de YY1 y KLF4. Los resultados aquí mostrados evidencian

la participación del eje miR-7/YY1/KLF4 en la fisiopatogénesis de la enfermedad y permite proponerlos como potenciales blancos terapéuticos.

5. Marco Teórico

5.1 Cáncer

El cáncer es definido como un conjunto de enfermedades, cuya característica definitoria refiere un desbalance entre la generación y muerte celular, promoviendo un crecimiento celular descontrolado que a su vez puede generar la formación de un tumor con la capacidad de invadir otros tejidos, proceso conocido como metastasis^{1,2}.

El desarrollo del cáncer tiene varios factores asociados, los cuales puede ser modificables tales como estilo de vida, consumo de tabaco, obesidad, factores ocupacionales y los no modificables como mutaciones genéticas, niveles hormonales alterados y condiciones inmunes³⁻⁵. Estos factores pueden actuar de manera simultánea o en secuencia para originar e inducir la progresión del cáncer⁶. Actualmente, esta enfermedad es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que, a pesar de los avances en investigación y tratamiento, anualmente fallecen millones de personas a causa de este padecimiento⁷. Reportes de la Sociedad Americana del Cáncer indican que a nivel mundial una de cada siete muertes está relacionada con algún tipo de cáncer y de acuerdo con GLOBOCAN 2020 y la Agencia internacional para la investigación en cáncer, IARC por sus siglas en inglés, hasta noviembre del 2020, en todo el mundo, se estimó un total de 19.3 millones de casos de cáncer así como un total de 9.9 millones de muertes⁸. Se estima que para 2030 se registre un total de 21.6 millones de nuevos casos y trece millones de muertes, esto tomando en cuenta solo el aumento de la población⁹.

A nivel mundial los diferentes tipos de cáncer que se presentan con mayor frecuencia son: cáncer de pulmón (11.6%), mama (11.6%), próstata (7.1%), colon (6.1%), estomago (5.7%), hígado (4.7%), recto (3.9%), esófago (3.2%), cervicouterino (3.2%), tiroides (3.1%), vejiga (3%) y LNH (2.8%), entre otros. Particularmente en nuestro país se reportó estimado de 190,667 nuevos casos de cáncer en total. Los cuales por orden de incidencia son: Mama (15.9%), Próstata (14.60), Tiroides (7.06%), Colon (6.09%), Cervicouterino (4.59%),

Pulmón (4.55%), estómago (4.40%), cuerpo uterino (4.23%), Hígado (4.23%), Leucemia (3.73%), Linfoma No-Hodgkin (3.02%), Páncreas (2.83%), etcétera⁹. Este trabajo se enfoca en el estudio del LNH, el cual ocupa la onceava posición en cuanto a incidencia con un estimado de 5,174 nuevos casos en el 2018, los cuales representan el 3.02% de todos los nuevos casos de cáncer en el país. En cuanto a mortalidad, el LNH representa el 3.57% del total de muertes con 2,741 muertes para el mismo año.

5.2 Linfoma

Se define al linfoma como una neoplasia linfoide altamente heterogénea con alteraciones genéticas y alteraciones en los perfiles de expresión génica¹⁰. El linfoma deriva principalmente de linfocitos, células responsables de la respuesta inmunológica¹¹, en diversos grados de diferenciación y ocurre en una población esencialmente de un solo tipo de célula¹². Existen dos tipos de linfoma, Linfoma No-Hodgkin y de Hodgkin (LH), también conocido como enfermedad de Hodgkin, nombrado así en honor al Dr. Thomas Hodgkin, quien lo describió por primera vez en 1832 como una nueva enfermedad, se sabe que es el resultado de una transformación maligna de un linfocito B del centro germinal o del post-centro germinal. El LH representa el 10% de los linfomas¹³ y tiene como característica esencial, la presencia de células denominadas Red-Sternberg, mientras que todos los demás tipos de linfomas son denominados Linfoma No Hodgkin, siendo estos últimos los que, además de una mayor frecuencia, presentan una mayor agresividad, es por ello que de manera particular en este trabajo nos enfocamos en el Linfoma No Hodgkin.

5.3 Linfoma No-Hodgkin

El LNH, comprende varios subtipos, de los cuales el 85-90% derivan de linfocitos B, mientras que el resto derivan de linfocitos T y células NK. Los diferentes subtipos derivados de linfocitos B y T han sido clasificados basados en hallazgos clínicos, morfología, inmunofenotipificación y genética molecular. De estos subtipos resaltan el Linfoma Folicular y el Linfoma Difuso de Células B Grandes (DLBCL por sus siglas en inglés: Diffuse Large B Cell Lymphoma) incluyendo sus dos subtipos definidos como DLBCL-ABC de células B activadas o DLBCL-GCB de células de centro germinal ¹⁴, en conjunto el LF y DLBCL representan el 65% del total de los LNH¹⁵. Armitage et al ¹⁵, refieren al LNH como el paradigma

del cáncer basado en translocaciones, debido principalmente a que las translocaciones ocurridas, producen una alteración en la expresión de los genes. El 85% de los LNH tienen anormalidades citogenéticas, por lo tanto, los defectos cromosómicos clonales son indispensables en la linfomagénesis. Como ejemplos de estas translocaciones, en los linfocitos B, la translocación (9;14)(p13;q32) se observa en los linfomas linfoplasmocitoides, la t(11;14)(q13;q32) en los linfomas del manto, la t(2;18)(p11;q11) en los linfomas difusos de células grandes y la t(2;5)(p23;q35) de los linfomas CD30⁺ y anaplásicos de células grandes¹⁶. El Linfoma Folicular es consecuencia de la translocación t(14;18)(q32;q21), cuyo resultado es una activación constitutiva de BCL-2¹⁷. Siendo este un signo patognomónico de linfoma subtipo folicular¹⁸. La translocación t(8;14)(q24;q32) es propia de linfoma de Burkitt cuyo resultado es una sobre expresión de MYC¹, mientras que el DLBCL puede tener alteraciones en MYC y BCL-2 (doble hit)¹⁹ y/o BCL-6 (triple hit)²⁰.

5.4 Fisiopatología de LNH

Durante el desarrollo de linfocito B, ocurren procesos en los cuales ocurre una rápida proliferación celular y rompimiento del DNA de doble cadena, denominados hipermutación somática y recombinación por cambio de isotipo para la generación de anticuerpos²¹, los cuales ocurren de manera específica en el centro germinal y suponen un potencial riesgo, debido a que son procesos propensos a errores²². De manera normal, procesos de reparación del DNA son activados, sin embargo, el rompimiento de las cadenas de DNA puede contribuir a la translocación cromosómica en linfoma¹⁵, además de que los potenciales errores debidos a la rápida renovación celular y el daño al DNA son atentamente cuidados por varios factores de transcripción como son BCL-6, MYC y PRDM1¹⁵, los cuales han sido asociados al desarrollo del LNH²³.

Además de los factores genéticos existen otras consideraciones de riesgo para el desarrollo de LNH, entre ellos se encuentran desordenes inmunológicos, medicamentos, infecciones, estilo de vida especialmente obesidad²⁴, raza, historia familiar y factores ocupacionales^{3,5}. Un grupo de personas que muestra un incremento considerable en el riesgo de desarrollar LNH son los pacientes cursan con inmunosupresión sea por infección con VIH o bien inducida como es el caso de los pacientes trasplantados²⁵. Diversos reportes señalan otras

infecciones asociadas al desarrollo de LNH. A resaltar es la infección con *Helicobacter pylori* asociada a linfoma tejido asociado a mucosas (MALT)²⁶; El virus de Epstein-Barr se ha asociado con Linfoma de Burkitt²⁷, además la infección con el virus de la hepatitis C, ha sido asociado con MALT y DLBCL²⁸. El conjunto de los datos biológicos permite la clasificación e identificación de cada linfoma, mientras que el conjunto de datos clínicos, la evolución, los aspectos morfológicos e inmunofenotípico, se sustentan en las anomalías moleculares. El avance de la biología básica, los análisis anatomopatológicos basados en nuevas tecnologías, como anticuerpos monoclonales, técnicas de inmunohistoquímica, hibridación “*in situ*” y de amplificación genética, permiten reconocer factores etiológicos, mecanismos fisiopatológicos y designar entidades clínico-biológicas a partir de clasificaciones morfológicas descriptivas y anatomo-clínicas.

5.4.1 Linfoma difuso de células B grandes.

El linfoma difuso de células B grandes o DLBCL es el subtipo más común de LNH, representando entre el 60-70% de los linfomas agresivos, es mucho más heterogéneo²⁹ en términos de comportamiento clínico y características histomorfológicas, comparado con otros grupos de linfomas, tales como el linfoma de células del manto, linfoma linfocítico pequeño y linfoma de Burkitt³⁰⁻³². El DLBCL se presenta sobre un gran rango de edades con manifestaciones en sitios nodales o extranodales³³. De manera general se señala que el 60% de pacientes adultos con DLBCL responden bien a la terapia y tienen una supervivencia prolongada, el resto muere por la enfermedad³¹, sin embargo, en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología de México, se realizó un análisis multivariado comprendiendo varios parámetros clínicos tales como anemia, enfermedad voluminosa así como la escala ECOG, el cual permitió identificar tres grupos pronóstico con bajo, intermedio y alto riesgo, con una probabilidad de supervivencia de 80.05, 55.5 y 29.84% respectivamente³⁴.

Dentro de este tipo de linfoma se han identificado dos subgrupos de DLBCL por análisis de microarreglos de DNA, con diferente pronóstico: a) uno con un patrón de expresión génica similar al de los linfocitos B de centros germinales y b) DLBCL con un patrón de expresión similar a linfocitos B activados, expresando

genes normalmente inducidos durante la activación *in vitro* de linfocitos B de sangre periférica ³⁵. Los marcadores establecidos permiten distinguir entre los DLBCL de origen de linfocitos B de centros germinales (CG) (CD10, Bcl-6, CD40 y CD23) de los de origen de linfocitos B activados (ABC)(MUM/IRF4 y CD138). Ellos sugieren que el patrón de expresión de linfocitos B de CG correlaciona con mejor pronóstico que los que expresan un patrón de linfocitos B activados. Demostrando que este análisis por inmunohistoquímica tiene resultados similares a los obtenidos cuando se utilizan microarreglos de cDNA de manera independiente del índice pronóstico internacional (IPI) ³⁶.

5.4.2 Linfoma folicular

El linfoma folicular (LF) es una neoplasia sistémica del tejido linfoide, es además un subtipo de LNH que representa un aproximado de 20 a 25% de los LNH, caracterizado por una apariencia morfológica de estructura folicular, y un patrón de crecimiento nodular³⁷. Al igual que otros subtipos de LNH, el LF es caracterizado por translocaciones, más del 85% de los casos de LF tienen la translocación t(14;18)(q32;q21), la cual tiene como consecuencia el posicionamiento del oncogén BCL-2 bajo el control transcripcional de las regiones reguladoras de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas ³⁸, lo que induce la expresión constitutiva de la proteína antiapoptótica BCL-2, por lo tanto, las células adquieren resistencia a la apoptosis.

La supervivencia de los pacientes que cursan con linfoma folicular es en promedio de 15 años o más con el uso de anticuerpos monoclonales como terapia^{39,40}, para la predicción de la supervivencia en linfoma folicular se ha utilizado la evaluación de la progresión de la enfermedad dentro de los 24 meses del primer tratamiento (POD24 por sus siglas en inglés) ⁴¹. Siendo la progresión de la enfermedad dentro de los primeros 24 meses un predictor robusto de una supervivencia reducida⁴².

Por otro lado, los pacientes que cursan con una enfermedad asintomática se maneja una conducta expectante, es decir un periodo en que solo hay observación, pero no suministrar tratamiento. Sin embargo, eventualmente todos los pacientes van a requerir tratamiento sistémico ⁴³.

5.4.3 Linfoma de Burkitt

El linfoma de Burkitt es un subtipo de LNH, que se origina en linfocitos B del centro germinal. Es caracterizado por la presencia de una translocación que promueve una expresión constitutiva del oncogén c-myc, rápida división celular y por consiguiente elevada proliferación⁴⁴. Clínicamente es el subtipo de linfoma que más rápido progresa y es muy agresivo debido a que es capaz de diseminarse al sistema nervioso central. Diversos estudios reportan una supervivencia del 80 al 90% en adultos con un promedio de edad de 25 años, con regímenes como CODOX-M-IVAC (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina-metrotrexato, etopósido, ifosfamida, y citarabina)⁴⁵ hyper CVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, metrotrexato y citarabina)⁴⁶. Los pacientes que no responden al tratamiento intensivo difícilmente sobreviven⁴⁷.

5.5 Blancos terapéuticos y biomarcadores en LNH.

Además de las translocaciones características de los diferentes subtipos de linfomas, la identificación de reguladores de la transcripción tales como factores de transcripción y miRNAs, son de gran interés debido a su importante participación en la promoción del cáncer, así como sus potenciales implicaciones terapéuticas y usos como biomarcadores.

El uso de nuevas tecnologías tales como microarreglos de expresión y secuenciación masiva, han permitido la exploración de mecanismos moleculares y el descubrimiento de nuevos biomarcadores en la linfomagénesis a nivel genético, epigenético y proteico, así como a nivel de microambiente tumoral⁴⁸. Específicamente en DLBCL además de los subtipos GC y ABC, el análisis genético de 304 adultos diagnosticados con esta patología, permitió establecer 5 subtipos de linfoma identificados en 5 clústeres de expresión génica diferencial⁴⁹. Por lo que se ha establecido un panel de biomarcadores que han permitido una clasificación más detallada, estratificación por desenlace y terapias personalizadas⁵⁰. **Figura 1.**

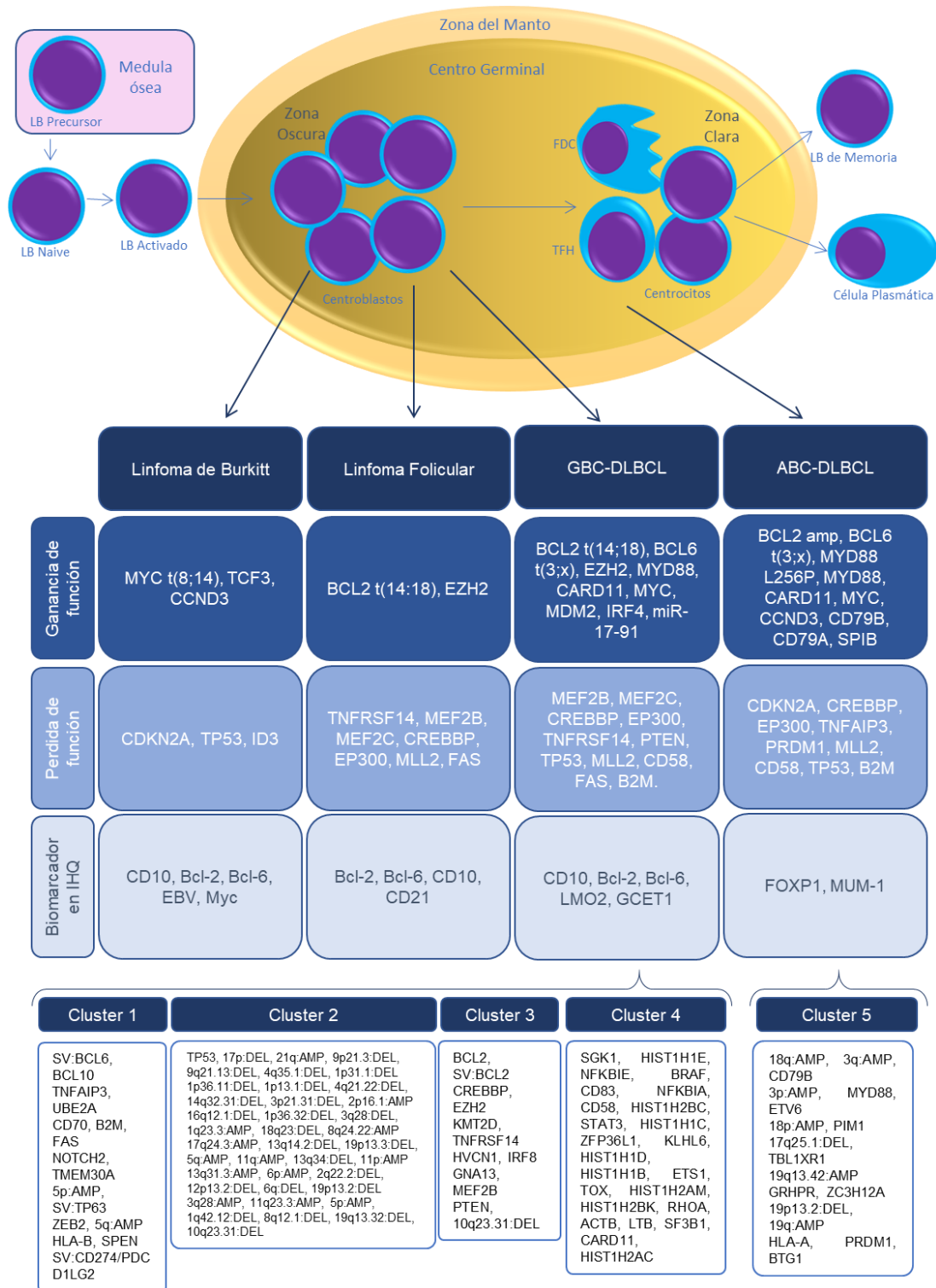


Figura 1. Biomarcadores reportados en subtipos de LNH. En la parte superior se esquematiza la maduración de los linfocitos B y se indica en que proceso son generados los diferentes subtipos de LNH. Estos subtipos han sido clasificados dependiendo de la expresión de varios biomarcadores, los cuales pueden indicar una ganancia o pérdida de función, así como su utilidad mediante la técnica de IHQ. Adicionalmente se muestran los clústeres de expresión de los diferentes subtipos de DLBCL-ABC y DLBCL-CG⁴⁹. Modificada de: Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine ⁵⁰.

En el contexto de LNH, nuestro grupo de investigación ha reportado varios factores de transcripción con una importante participación en generación, promoción y desarrollo del LNH, estos reportes han sentado las bases para proponerlos como biomarcadores y blancos terapéuticos, entre los factores de transcripción estudiados se encuentran KLF4 y YY1. En LNH pediátrico de subtipo Burkitt se reportó que KLF4 se encuentra sobre expresado y además es un potencial biomarcador ya que la expresión elevada fue asociada a pobre supervivencia general ⁵¹. Por otro lado el factor de transcripción Ying-Yang1 (YY1), se ha asociado a la quimioresistencia debido principalmente a su papel en la regulación sobre MDR1 ⁵², así como la resistencia a la apoptosis por su efecto regulador en Fas ^{53,54}. Finalmente, de manera reciente reportamos que YY1 es capaz de regular a KLF4 de manera transcripcional, lo que es congruente con la participación de ambos factores en LNH, cabe resaltar que la expresión de ambos factores en tejidos de pacientes diagnosticados con la enfermedad tiene una correlación positiva⁵⁵, lo que en conjunto con lo anteriormente mencionado permite proponerlos como potenciales biomarcadores en esta enfermedad ⁵⁶ y resalta la importancia del estudio de estos factores así como las posibles redes de regulación en su entorno.

5.5.1 Factor de Transcripción tipo Krüppel 4 (KLF4)

Los factores de transcripción de Tipo Krüppel (KLF por sus siglas en inglés Krüppel-Like Factors) comprende una gran familia de factores de transcripción con dedos de zinc identificado por primera vez en *Drosophila melanogaster*, los cuales se expresan en tejido selectivo, regulando diversas funciones biológicas. Análisis filogenéticos indican que la proteína KLF está relacionada con un gran porcentaje de similitud a otras familias de dedos de zinc como Sp1 y Krox; sin embargo, la familia KLF presenta tres dedos de zinc conservados. Los KLF's regulan la decisión final de la célula, incluyendo el desarrollo y la diferenciación de tejidos específicos. La especificidad funcional de los distintos miembros de la familia de KLF es mantenerse a través de la transactivación y/o represión de los dominios ubicados en la región amino-terminal de la proteína y a través de la expresión tisular ⁵⁷.

KLF4 es un factor de transcripción miembro de la familia de KLF y es expresado en una gran variedad de tejidos de mamíferos, esta proteína juega un papel importante en la regulación de diversos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, desarrollo, mantenimiento de la homeostasis tisular y apoptosis. KLF4 fue identificado y caracterizado inicialmente en el ratón en 1996 y posteriormente en el humano a partir de una biblioteca de cDNA de células endoteliales de cordón umbilical ⁵⁸. Posteriormente se le denominó KLF4 y se le encontró expresado en pulmón, testículo, timo, cornea, miocitos ⁵⁹ y linfocitos ⁶⁰. Así mismo, se reportó que la alta expresión de KLF4 en los linfocitos se traduce en una baja regulación de la actividad celular ⁶¹, mientras que durante el desarrollo de los linfocitos humanos, KLF4 es expresado diferencialmente, con altos niveles en los estadios pre-B-I y pre-B-II en comparación con los largos estadios pre linfocito B ⁶². Así, la expresión de KLF4 en el linaje B correlaciona con una proliferación celular baja, implicando un rol en el desarrollo de linfocitos B similar a la función en la diferenciación de la piel. Estudios recientes han demostrado que KLF4 exhibe una reducción dramática en su expresión después de la activación, además se ha visto que expresa niveles bajos en varios linfomas de linfocitos B y linfocitos B activados, comparado con los linfocitos B en reposo. KLF4 es uno de los genes que junto con c-Myc, Oct3/4, Sox2 y Nanog es requerido para el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de células progenitoras troncales (iPS, del inglés induced pluripotent stem). Interesantemente, estudios recientes muestran que la eliminación de la expresión de KLF4 disminuye la proporción de células troncales tumorales en cáncer de mama ⁶³, lo que supone una importante participación de KLF4 en malignidades.

5.5.2 KLF4 en malignidades

Diversos estudios han reportado que KLF4 puede actuar como supresor tumoral o como oncogén⁶⁴. Como se mencionó anteriormente, KLF4 juega un papel crucial como factor de transcripción en la regulación de la proliferación celular y debido a que los diferentes tipos de cáncer muestran un crecimiento celular desregulado, KLF4 ha sido considerado como un factor clave en el desarrollo y progresión del cáncer. La expresión de KLF4 se ha visto disminuida en una gran variedad de tipos de cáncer y por ello se ha propuesto como supresor tumoral.

Sin embargo, su papel en la progresión del cáncer no ha sido dilucidado ya que también ha sido descrito que puede actuar como un oncogén en algunos tipos de cáncer. Evidencia clínica sugiere a KLF4 como un supresor tumoral, ya que se ha reportado disminución en la expresión de KLF4 en diversos tumores, como; esófago, estómago, colon, vejiga, pulmón y leucemia de linfocitos T ⁶⁵⁻⁷². Mientras que la restauración de la expresión de KLF4 induce arresto en el ciclo celular en células de cáncer de colon, las alteraciones epigenéticas de KLF4 pueden ser la causa de los diferentes tipos de cáncer gástrico y colorrectal. Por otro lado, en carcinomas epiteliales y de cavidad bucal, KLF4 ha sido identificado como promotor oncogénico debido a que KLF4 es capaz de inhibir a p53, induciendo así la transformación oncogénica en ausencia de ciclina D1 y p21. Mientras que en malignidades de linfocitos B, KLF4 induce una elevada expresión de p21, c-Myc y ciclina D2, teniendo así una importante participación en la regulación del ciclo celular ⁷³.

En otros tipos de cáncer, KLF4 se encuentra sobre expresado cuando hay daño en DNA dependiente de p53 y puede impedir la transición de G1-S y G2-M en líneas celulares de cáncer de colón. Por otro lado en cáncer de mama cuando la proteína inhibidora del ciclo celular p21CIP es inactivada, y existe una elevada expresión de KLF4, este puede actuar suprimiendo a p53, contribuyendo al fenotipo maligno del cáncer de mama⁷⁴. Soportando el posible papel como oncogén de KLF4, recientes estudios demostraron que la reducción de la expresión de KLF4 disminuye la proporción de células troncales tumorales en cáncer de mama y reduciendo las características de células troncales tumorales⁷⁵.

En el contexto de malignidades hematológicas, KLF4 puede actuar como supresor tumoral u oncogén, dependiendo el contexto celular en el que se encuentre ⁷⁶. Se ha reportado que el silenciamiento epigenético, debido principalmente a la metilación en el promotor de KLF4 en linfomas de linfocitos B y particularmente en LNH, favorece la supervivencia de las células tumorales, debido a la pérdida del control del ciclo celular y evasión de mecanismos antiapoptóticos ⁶⁵. Este mecanismo también se ha reportado en leucemia de linfocitos T en adultos, en la que la infección con el virus linfotrópico de células T humanas tiene como consecuencia la hipermetilación del promotor de KLF4,

lo que resulta en una disminución en la expresión de KLF4 y en consecuencia un incremento en la supervivencia de células leucémicas ⁷⁷.

Adicionalmente se ha reportado que una sobreexpresión de KLF4 es capaz de inducir un arresto en el ciclo celular, mientras que la expresión inducible de KLF4 fue directamente relacionada con la eliminación de células pre-B de leucemia en un modelo murino, lo cual soporta su papel como supresor tumoral ⁷⁰.

Otro mecanismo por el cual KLF4 ha sido reportado como supresor tumoral en leucemia es que se ha encontrado una correlación inversa de este factor de transcripción vs HDAC1. HDAC1 es una deacetilasa de histonas que se encuentra altamente expresada en pacientes con leucemia y compite con KLF4 por la unión al promotor de KLF4, lo cual da como resultado una baja expresión del factor de transcripción ⁷⁸. De manera particular en células de leucemia mieloide, la expresión de KLF4 ha sido relacionada con la inhibición el ciclo celular mediante la inducción de la expresión de p21 y p27 ⁷⁸. Mientras que en leucemia linfoblástica de linfocitos T, la expresión inducible de KLF4 se relacionó directamente con un aumento en la activación de la caspasa 3, aumento de la expresión de TRAIL y la disminución de la expresión de BCL-2, lo cual sugiere nuevamente un papel como supresor tumoral, dada la promoción de la apoptosis⁷⁹.

Adicionalmente, en linfocitos B, se ha reportado que la expresión inducible de KLF4 bloquea la transformación celular, inhibiendo la proliferación e induciendo muerte celular. Estos datos sugieren que KLF4 tiene un papel como supresor tumoral, en malignidades de linfocitos B, lo cual es consistente con los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, en los que, como previamente se describió, se reportó que en LNH pediátrico subtipo Burkitt existe una alta expresión de KLF4 y que esta correlaciona directamente con una pobre supervivencia en pacientes pediátricos así como una nula respuesta al tratamiento⁸⁰.

En otras neoplasias hematológicas, el papel como oncogén de KLF4 también responde a varios mecanismos y procesos. En mieloma múltiple se ha reportado que la resistencia a los inhibidores de proteasoma depende de KLF4 debido a su capacidad para regular la expresión de SQSTM1/p62, confiriendo resistencia a la terapia mediante la regulación de la autofagia ⁸¹.

De manera muy interesante, en biopsias de pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, se ha reportado la regulación de la expresión de KLF4 por el miR-2909. Así, mismo se ha reportado que la región 3'UTR de KLF4 se encuentra mutada, por lo que KLF4 no responde a la inhibición por el miR-2909, adicionalmente existe una segunda mutación de KLF4 en dedo de zinc, por lo que KLF4 no puede ejercer su función como supresor tumoral ⁸², siendo esto una posible causa para el desarrollo de la malignidad.

Otro microRNA involucrado en la regulación de KLF4 es miR-7, en células troncales tumorales de cáncer de mama se reportó que miR-7 es capaz de inhibir la expresión de KLF4 y como consecuencia bloquear la metástasis de estas células hacia cerebro ⁸³.

Finalmente cabe mencionar que el mecanismo que genera la alta expresión de KLF4 en linfomas no ha sido dilucidado; sin embargo, recientemente hemos descrito que la expresión de KLF4 está regulada transcripcionalmente por el factor de transcripción YY1, lo cual es consistente con el análisis de expresión realizado mediante inmunohistoquímica en muestras de pacientes diagnosticados con LNH subtipos folicular y DLBCL, cuyo resultado arroja una correlación positiva entre la expresión de ambos factores de transcripción ⁵⁶. De manera muy interesante, se ha reportado que miR-7 además de regular a KLF4 ⁸³ es capaz de regular al factor de transcripción YY1 en cáncer colorrectal ⁸⁴. Sin embargo, el papel del miR-7 y su posible efecto en la regulación de KLF4 y YY1 en el LNH no ha sido estudiado y resulta de gran interés debido a que este eje podría representar un mecanismo implicado en el desarrollo de LNH. Por su parte el factor de transcripción YY1 ha sido asociado a una pobre supervivencia en linfoma folicular y DLBCL, así como con una progresión tumoral de malignidades de linfocitos B ^{85,86}

5.5.3 Factor de Transcripción YY1

El factor de transcripción YY1 (Yin Yang 1), también conocido como δ , NF-E1, UCRBP y CF, tiene un peso aproximado de 68 kDa, ubicuo y multifuncional que posee cuatro dedos zinc con dos dominios específicos que caracterizan su función como represor o activador. La represión transcripcional ocurre en el C-terminal y el N-terminal actúa como un potente dominio activador ⁸⁷. Se ha estimado que más del 7% de los genes de los vertebrados tienen sitios de unión

a YY1; el cual está involucrado principalmente en los procesos biológicos normales como la embriogénesis, diferenciación, replicación, proliferación celular y apoptosis. La acumulación nuclear de YY1 durante la transición coincide con el incremento en la actividad de YY1 en la unión al DNA y una alta regulación de genes de histonas. Además, la expresión y función de YY1 está asociada a la resistencia a estímulos apoptóticos, tumorigénesis y metástasis. También, regula citocinas proinflamatorias tales como: iNOS (NO sintasa inducible), IL-1, NO y TNF- α , entre otras ⁸⁷. Aunque YY1 está altamente expresado en las células del sistema inmune, la función de este factor en la respuesta inmune apenas empieza a comprenderse. La pérdida temprana de YY1 en el desarrollo de los linfocitos B y la eliminación del locus de inmunoglobulinas, resulta en una importante reducción de linfocitos B maduros en la periferia ⁸⁸.

Recientemente se ha demostrado que YY1 está involucrado en la transformación de linfocitos B, la cual conlleva al desarrollo de linfomas de alto grado, mediante la regulación del ciclo celular en el desarrollo normal de estos linfocitos ⁸⁹. También se ha relacionado la expresión de YY1 en intervalos cortos de supervivencia en linfoma folicular y en DLBCL ⁸⁶. La desregulación de la expresión de YY1 se ha asociado con la oncogénesis y la sobreexpresión de YY1 se ha reportado en diferentes tipos de cáncer ⁹⁰. Nuestro grupo y otros investigadores, han reportado un incremento en la expresión de YY1 en malignidades hematológicas, como en linfoma folicular, DLBCL y recientemente en mieloma múltiple, esta alta expresión correlaciona con una pobre respuesta al tratamiento^{85,91,92}. De igual forma, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han encontrado un incremento en la expresión de YY1 en linfomas pediátricos de Burkitt y esta expresión correlaciona con la expresión de KLF4. Adicionalmente mediante análisis bioinformáticos encontramos que existen dos sitios de unión para YY1 en el promotor de KLF4, por lo que mediante ensayos de gen reportero y silenciamiento mediante siRNAs, reportamos por primera vez que YY1 es capaz de regular transcripcionalmente a KLF4 en líneas celulares de LNH, este hallazgo fue confirmado mediante el análisis de expresión de ambos factores en biopsias de pacientes diagnosticados con LNH y en bases de datos públicas, el análisis de ambas fuentes arrojó una correlación positiva entre ambos factores, lo que confirma el papel regulador de YY1 sobre KLF4⁵⁵.

Recientemente se ha demostrado en cáncer colorrectal, que miR-7 es capaz de inhibir de manera directa la expresión de YY1, evidenciando el papel oncogénico de YY1, lo cual fue confirmado mediante la expresión inducida de miR-7 que da como resultado inhibición de proliferación e inducción de apoptosis en este tipo de cáncer ⁸⁴. Por lo que conocer el papel de miR-7 en la posible regulación de YY1 en otros tipos de cáncer como el linfoma es de gran interés en el entendido que se ha reportado la expresión de YY1 y miR-7 de manera independiente en diferentes tipos de linfomas.

5.6 miRNAs y cáncer

Los miRNAs, son pequeñas moléculas de RNA de 20 a 25 nucleótidos de largo ⁹³. Son transcritos del genoma y procesados por las enzimas “Drosha” y “Dicer” a partir de transcritos largos para finalmente formar miRNAs maduros de aproximadamente 22 nucleótidos, los cuales son capaces de llevar a cabo el silenciamiento o decaimiento de la traducción. **(Figura 2)** ⁹⁴. Existe evidencia que confirma que los miRNAs están involucrados en procesos como proliferación celular, migración, apoptosis y senescencia⁹⁵. Por otro lado, la regulación de los miRNAs está caracterizada por que sus genes tienen más de un sitio de inicio de la transcripción ⁹⁶, los cuales pueden estar localizados en secuencias intrónicas de algunos genes codificantes, así que su transcripción se comparte con la del promotor del gen codificante ⁹⁷, esto ha permitido un mejor entendimiento del impacto de los miRNAs en funciones y su participación en la patología del cáncer ⁹⁸. Sin embargo se han reportado un gran número de miRNAs que juegan un papel bifuncional como oncogenes y supresores tumorales en distintos tipos de cáncer ⁹⁹.

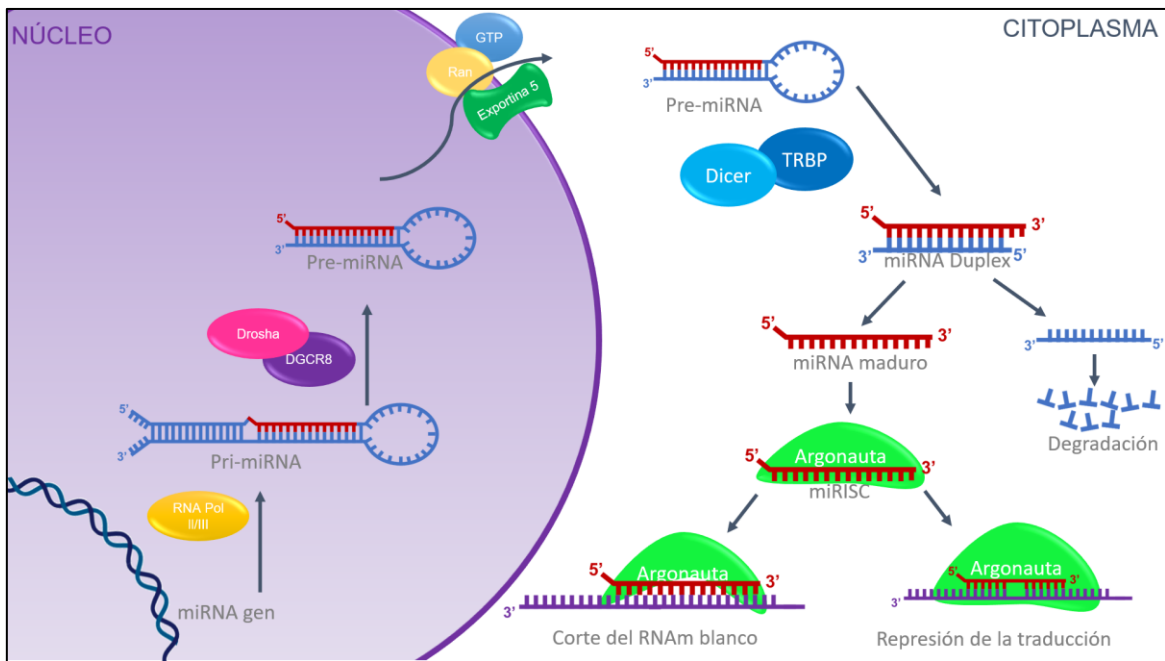


Figura 2. Biogénesis de los miRNAs. Esquema general de la generación de miRNAs y su mecanismo de acción. Modificado de “MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex”⁹⁴.

Desde el descubrimiento de los miRNAs se les ha atribuido una importante participación en el desarrollo de diversas patologías y particularmente del cáncer, por lo cual se ha hecho énfasis en el estudio de miRNAs y sus características tales como la alta presencia de islas CpG en los promotores de los genes de los miRNAs lo que sugiere que la metilación podría tener un efecto importante¹⁰⁰, es decir si estos miRNA actúan como genes supresores tumorales, su hipermetilación y subsecuente silenciamiento transcripcional favorecería la progresión tumoral¹⁰¹. Un ejemplo de este proceso, es la disminución del miR-34 debido a la hipermetilación de su promotor, el cual ha sido identificado en muestras primarias de leucemia linfocítica crónica (LLC) mieloma y linfoma¹⁰². Paradójicamente, los miRNAs también pueden regular la maquinaria epigenética¹⁰³, evidencia sugiere que el miR-29b puede regular agentes que metilan el DNA como DNMT1 y DNMT3¹⁰³, además la presencia de islas CpG en los promotores de miRNA, se traduce como un sitio con mayor susceptibilidad a la afectación por diversos factores, pues se ha reportado que genes que codifican a miRNAs están frecuentemente localizados en sitios frágiles o regiones genómicas, típicamente asociadas a cáncer, llamadas regiones genómicas asociadas a cáncer (CAGRs)¹⁰⁴.

De manera muy interesante, se ha demostrado que la reversión de la alteración en la expresión de un miRNA específico, sea mediante el uso de miRNAs sintéticos o antagonistas, puede normalizar la red de genes reguladores y las vías de señalización y de manera muy importante revertir el fenotipo de células tumorales¹⁰⁵.

La participación de miRNAs con roles específicos en los diversos sellos del cáncer¹⁰⁶, tales como metástasis, para el cual se ha reportado que, en cáncer de mama, el miR-10b funge un rol como promotor de metástasis. Se demostró *in vitro*, que la sobreexpresión de miR-10b resulta en la invasión tumoral y metástasis distal, en comparación con tumores no metastásicos¹⁰⁷. Por otro lado, la expresión de diversos miRNAs ha sido relacionada con la supresión de metástasis. Los miRNAs 335, 126 son capaces de suprimir la invasión, mientras que el miR-136 suprime la angiogénesis de la metástasis^{108,109}.

En relación a proliferación por ejemplo se ha reportado que en glioblastoma el miR-615 es capaz de inhibir la proliferación celular y debido a que su expresión esta inversamente correlacionada con sobrevida total y la expresión de EGFR que es blanco del miR-615¹¹⁰. Por otro lado, en cáncer de mama se reportó que el miR-21 correlaciona de manera directa con proliferación y que la inhibición de este miRNA suprime la proliferación celular y metástasis¹¹¹.

En el contexto de apoptosis se ha reportado que la sobreexpresión de miR-144-3p en células de cáncer de próstata resistente a castración, además de inhibir la proliferación es capaz de promover apoptosis mediante la regulación de su blanco CEP55¹¹². Mientras tanto en osteosarcoma, la sobreexpresión de miR-18a desarrolla un papel inverso debido a que promueve la proliferación e inhibe la apoptosis en células de osteosarcoma, probablemente por el efecto en la proteína CFI25¹¹³.

Otro sello distintivo del cáncer es la angiogénesis, proceso para el cual existen reportes de miRNAs involucrados, tal es el caso del miR-9 capaz de reducir los niveles de expresión de SOCS5 y permite la activación de la vía de JAK-STAT, la cual a consecuencia de la cascada de señalización promueve migración celular endotelial y angiogénesis¹¹⁴. En contraste los miR-15a, miR-16 han sido relacionados con la disminución de angiogénesis debido a su papel en la regulación de VEGF-A en mieloma múltiple, enfermedad en la que la infección con lentivirus para miR-15a y miR-16 resulto en disminución de angiogénesis¹¹⁵.

Además del papel en la regulación de angiogénesis, el miR-16 también ha sido relacionado con la estabilidad genómica, otro de los sellos distintivos del cáncer, específicamente en cáncer de mama se reportó que después del daño al DNA, la expresión de miR-16 se incrementa rápidamente, además se demostró que miR-16 es capaz de regular negativamente al oncogén Wip1 previniendo así la inestabilidad genómica ¹¹⁶. Por otro lado, en células sanguíneas diferenciadas, antagonizar al miR-24 resultó en una protección de muerte celular inducida por daño al DNA, mientras que mimetizar al miR-24 incrementa los rompimientos cromosómicos y daños al DNA no reparados, además de reducir la viabilidad en respuesta al DNA dañado ¹¹⁷Adicionalmente el miR-24 regula negativamente a p16 a nivel proteico, proteína involucrada en el proceso de senescencia replicativa¹¹⁸.

La inmortalidad o potencial replicativo, es otro de los sellos distintivos del cáncer, en el cual varios miRNAs han sido involucrados, entre ellos se encuentra el clúster miR-290 el cual regula la expresión de las DNA metil-transferasas dependientes de Rbl2, y como consecuencia de esto altera la homeostasis de la longitud telomérica ¹¹⁹.

Como parte de los sellos distintivos del cáncer, la regulación del sistema inmune es crucial y en esto también se han reportado que algunos miRNAs influyen directamente, un ejemplo de esto es el miR-155 el cual participa en la homeostasis y función del sistema inmune, particularmente se reportó que miR-155 es requerido para la función de linfocitos B y T así como células dendríticas ¹²⁰. Otro clúster de miRNAs involucrado en la regulación del sistema inmune, es el miR-17-92 el cual es esencial para el desarrollo de los linfocitos B mientras que su ausencia promueve la proteína proapoptóticas Bim e inhibe la transmisión de pro-B a pre-B ¹²¹

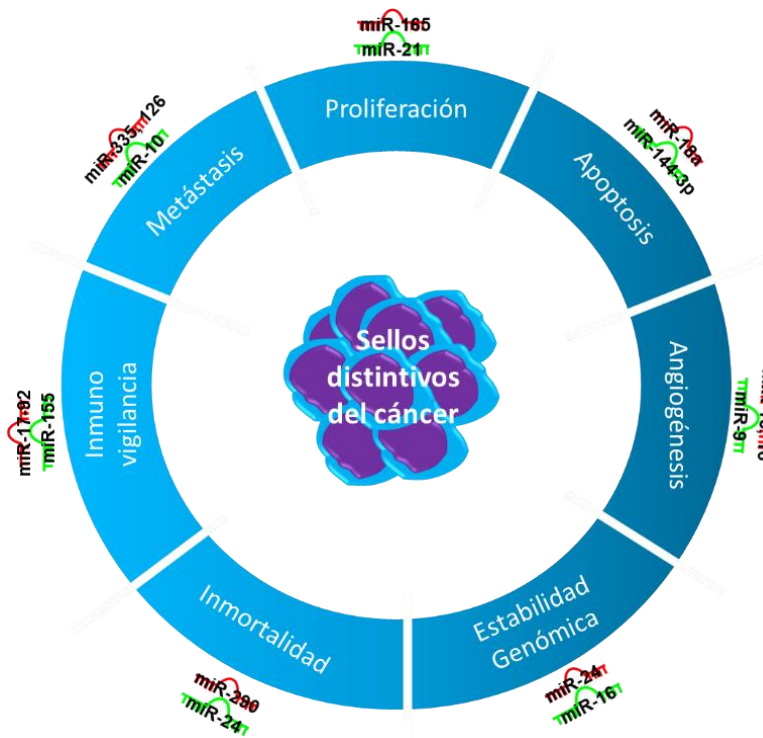


Figura 3. miRNAs y los sellos distintivos del cáncer. En cada sello distintivo del cáncer se encuentra dos ejemplos de miRNAs involucrados en la promoción o inhibición de este comportamiento, Basado en la revisión “Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection”¹⁰⁶.

5.6.1 miRNAs como biomarcadores.

Debido a los diferentes roles que desempeñan, los miRNAs han sido propuestos como candidatos a biomarcadores en varios tipos de cáncer¹²², incluyendo malignidades hematológicas¹²³. Se han propuesto perfiles de expresión que en conjunto funcionan como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico e incluso de predicción sobre la respuesta al tratamiento de diversos tipos de cáncer, tal como se revisó en un estudio por Huiyin Lan *et al*¹²⁴. En el cual, se realizó la clasificación de diversos miRNAs dependiendo de su función como biomarcador, los cuales se muestran en la **Tabla 1**¹²⁴.

Tipo de cáncer	Tipo de Biomarcador	MiRNAs biomarcadores
Cáncer de mama	Diagnostico	miR-10b, -21, -30a, -92a, -125b, -141, -145, -200, -801, -155, -191, -203, -210
	Pronostico	miR-10b, -373, miR-210
	Predictivo	miR-125b
Cáncer de Pulmón	Diagnostico	miR-21, -155, miR-16, miR-17, -19b, -25, -29c, -30c, -106a, -126, -451, -660, -28-3p
	Pronostico	miR-221, let-7a, -137, miR-372, -182, -15b, -16, -21, -126, -142-3p, -148a, -197
	Predictivo	miR-128b
Cáncer de hígado	Diagnostico	miR-222, -223, -181a, -181b, -181c, -200c, -203, -21, -224, -10b, -222, 126, -96
	Pronostico	miR-21, -22, -26, -29, -31, -122, -124, -135a, -139, -145, -146a, -155, -200c, -221, -222, -222, -223
	Predictivo	miR-21, -200b
Cáncer Colon	Diagnostico	miR-15b, -18a, -29a, -335, miR-17-3p, -20a, -21, -92, -601, -760, -29a
	Pronostico	miR-141
	Predictivo	miR-127-3p, -92a, -486-3p, -378, let-7g, miR-181b
Cáncer pancreático	Diagnostico	miR-205, -21, miR-642b, -885-5p, -22, -145, -150, -223, -636, -26b, -34a, -122, -126*, -145, -150, -223, -505, -636, -885.5p
	Pronostico	miR-130b, miR-21, -105, -196a-2, -203, -210, -222, -452, -105, -127, -187, -518a-2, -30a-3p
	Predictivo	miR-21
Cáncer de próstata	Diagnostico	miR-30c, -622, -1285, miR-10b, -373, let-7c, -7e, -141, -375, miR-26a, -195
	Pronostico	miR-141, -375, miR-20a, -21, -141, -145, -221
	Predictivo	miR-21
Cáncer de ovario	Diagnostico	miR-200 familia, let-7 familia, miR-21, -29a, -92, -93, miR-126, -127, -132, -155, -214, -182, -205, -144, -222, -302
	Pronostico	miR-410, -645, miR-200 familia, miR-141, -429
	Predictivo	MiR-23a, -27a, -30c, let-7g, -199a-3p, -181a, -181b, -213
Linfoma No Hodgkin	Diagnostico	MiR-155, -21, -221, -210, -150, -125
	Pronostico	MiR-21, -155, -18a, -25, -33, -223, -222, -221
	Predictivo	miR-21, -23a, -19a, -195, -127

Tabla 1. miRNAs como potenciales biomarcadores. Clasificación de los microRNAs reportados en diferentes tipos de cáncer y su papel como biomarcador. Modificada de MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges ¹²⁴ y MicroRNA profiles in B-cell non-Hodgkin Lymphoma ¹²⁵

De manera específica, recientes investigaciones han establecido a los miRNAs como factores determinantes en los diferentes comportamientos malignos, un ejemplo de ello son los miRNAs que han sido propuestos como predictores de quimio y radiosensibilidad en cáncer. Además se ha demostrado su capacidad para revertir la quimio o radio-resistencia en células de cáncer mediante la inhibición o la re-expresión de estos ^{126,127} También se ha demostrado que la

reversión de la alteración de un miRNA específico mediante miRNAs sintéticos o antagonistas puede normalizar la red de genes reguladores y las vías de señalización, revertir el fenotipo de células tumorales ¹²⁸, inhibir la proliferación de células tumorales, e inhibir la invasión tumoral y la metástasis ¹²⁷. Algunos de los miRNAs con demostrada participación en cáncer son: miR-125b, miR-145, miR-21 y miR-155 en cáncer de mama ¹²⁹, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92a-1 en linfoma ⁹⁹ y de manera muy importante para este trabajo, miR-7 ¹³⁰.

En el contexto de LNH, varios miRNAs han sido relacionados con la linfomagénesis y por tanto han sido propuestos como potenciales biomarcadores, entre los que se encuentran el miR-15A – 16-1 el cual tiene como gen blanco a BCL-2, una proteína antiapoptóticas, como se mencionó anteriormente, en leucemia linfocítica crónica, el locus donde se encuentra codificado este miRNA está ausente o mutado, evitando su papel en la regulación de su proteína blanco ¹³¹. Otro miRNA con participación en la linfomagénesis y con potencial como biomarcador es el miR-21, cuya expresión se encuentra aumentada en LNH ¹³². Entre los blancos de miR-21 se encuentran varios genes supresores de tumor, tropomiosina 1 (TPM1), muerte celular programada 4 (PDCD4), y maspin SERPINB5, en cáncer de mama y linfoma ¹³³. Otro ejemplo es el miR-155, el cual encuentra aumentado en DLBCL sin embargo la relevancia clínica aún no se conoce ¹³⁴. En este contexto existe una gran cantidad de estudios cuyo fin es evidenciar ya sea un perfil de expresión de miRNAs o bien la identificación de miRNAs individuales cuya expresión aberrante pueda ser relacionada con la malignidad o algún mecanismo de esta. Para esto existen dos estrategias para modular la expresión de los miRNAs desregulados, la primera comprende el uso de mimetizadores de los miRNAs supresores de tumor, para restablecer los niveles fisiológicos normales. El segundo se trata del uso de inhibidores de los miRNAs contra la sobreexpresión de los OncomiRs. Adicionalmente existen propuestas de métodos indirectos tales como el uso de fármacos epigenéticos como agentes desmetilantes del DNA o inhibidores de las desacetilasas de histonas, con el fin de re-expresar miRNAs silenciados a consecuencia de la epigenética ¹³⁵..

5.6.2 miR-7 en Cáncer

El análisis realizado por el grupo de Lagos-Quintana en el 2001, en donde se estudiaron los miRNAs del 1 al 33, se demostró que algunos de estos pueden tener un papel importante en el desarrollo del cáncer, así como también podrían actuar de manera específica de tejido. En esta publicación se menciona por primera vez al miR-7¹³⁶, el cual posteriormente se reportó que tiene tres loci diferentes en los cuales se encuentra codificado: 9q21, 15q26, y 19q13, que dan lugar a tres productos que se determinaron como pri-miR-7-1, pri-miR-7-2, pri-miR-7-3, los cuales tienen como termino la misma secuencia de miR-7. además, se sabe que esta evolutivamente conservado¹³⁷. Particularmente se ha encontrado que tiene una alta expresión en tejido normal de cerebro, bazo y páncreas¹³⁸. Existen varios reportes que señalan mecanismos de regulación miR-7, uno de ellos describe que el factor de transcripción HOXD10, es capaz de interactuar con la región promotora del gene putativo de miR-7-1 para inducir la expresión de miR-7¹³⁹. Otro factor de transcripción involucrado en la regulación de miR-7 es FOXP3¹⁴⁰. Así también se ha reportado que c-Myc es capaz de regular positivamente la expresión de miR-7 mediante la unión a su región promotora¹⁴¹. Además se ha reportado que proteínas involucradas en vías como factores de “splicing” pueden tener actividad regulatoria sobre miR-7 como ejemplo el factor SD2/ASf el cual interactúa con el transcrito de pri-miR-7 para promover la escisión por Drosha¹⁴². Los mecanismos involucrados en la respuesta inmune también han sido relacionados con la regulación de la expresión de miR-7 tal es el caso de TLR9 cuya señalización incrementa la expresión de HuR que a su vez genera un aumento en la expresión de miR-7¹⁴³. De la misma manera asociado a la regulación de TLR9 por el miR-7 puede tener efectos importantes en la regulación de la vía PIK3R3/AKT, esto en el contexto de cáncer de pulmón humano¹⁴⁴. De tal manera que se ha documentado el papel de miR-7 en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, como se muestran en la **Tabla 2.**

Blanco	Función	Tipo de cáncer
EGFR	Promueve sobrevida celular, proliferación, tumorigénesis, resistencia a blancos terapéuticos y radioterapia	Cabeza y cuello, Glioblastoma multiforme, cervical, pulmón, mama y próstata
RAF1	Promueve sobrevida celular	Pulmón, mama y HNC
PAK1	Promueve sobrevida celular, proliferación, motilidad celular, invasión, crecimiento y tumorigénesis	Mama, carcinoma de células escamosas de lengua, Schwannoma
IRS-1	Promueve proliferación	Glioblastoma multiforme, mama y cervical
IRS-2	Promueve sobrevida celular, proliferación, movilidad e invasión	Glioblastoma multiforme, pulmón, mama, próstata, carcinoma de células escamosas de lengua y melanoma Schwannoma
ACK1	Promueve proliferación celular y tumorigénesis	Schwannoma
PI3KCD	Promueve sobrevida celular, proliferación, tumorigénesis y metástasis	Carcinoma Hepatocelular
mTOR	Promueve sobrevida celular, proliferación, tumorigénesis y metástasis	Carcinoma Hepatocelular
P70S6K	Promueve sobrevida celular, proliferación, tumorigénesis y metástasis	Carcinoma Hepatocelular
BCL-2	Promueve resistencia a apoptosis, proliferación y tumorigénesis	Pulmón
XIAP	Promueve sobrevida celular y proliferación	Cervical
YY1	Promueve proliferación celular, proliferación y tumorigénesis	Colorrectal
CCNE1	Promueve sobrevida celular	Carcinoma Hepatocelular
PA28 gamma	Promueve sobrevida celular, proliferación y tumorigénesis	Pulmón
FAK	Promueve proliferación celular, sobrevida celular, tumorigénesis, movilidad celular y regula EMT	Glioblastoma multiforme y mama
KLF4	Promueve metástasis y auto renovación de células de cáncer tipo troncal	Mama
IGF1R	Promueve sobrevida celular, proliferación, migración, invasión y metástasis	Carcinoma de células escamosas de lengua, gástrico
MRP1	Promueve resistencia a quimioterapia	Mama
ERF	Reprime puntos de control en el ciclo celular	pulmón

Tabla 2. Blancos de miR-7. Genes blancos directos de miR-7 y sus funciones en diferentes tipos de cáncer Tomada y modificada de “microRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential”¹³⁷.

5.6.3 mir-7 en neoplasias hematológicas

Mediante análisis de actividad de 3'UTR se han identificado miRNAs que inhiben la expresión proteínas relacionadas de manera directa con la generación de la malignidad tales como TET2, (Ten-Eleven-Translocation 2), considerada un supresor tumoral importante que frecuentemente se encuentra mutado. Mientras que entre los miRNAs se ha reportado una alta expresión de miR-7 en leucemia mieloide aguda y se ha demostrado que los miRNAs podrían tener un potencial importante para el diagnóstico ¹⁴⁵. Por otro lado, en niños con leucemia linfoblástica aguda se ha identificado mediante perfiles de expresión de miRNAs, y confirmado mediante qRT-PCR un aumento o disminución de la expresión de miRNAs en comparación con niños diagnosticados con trombocitopenia utilizados como control. De hecho se ha propuesto mediante una correlación que la expresión de miRNAs, entre los que destaca miR-7, podría estar involucrados en la recaída temprana particularmente cuando miR-7, miR-216 y let-7i se encuentra altamente expresados ¹⁴⁶.

Por otro lado, se sabe que uno de los componentes de la sangre son las micro vesículas, las cuales pueden contener miRNAs, por esta razón, se han realizado análisis en los cuales se estudia la expresión de los miRNAs, contenidos en las microvesículas, con el fin de establecer patrones que comparen la expresión de los miRNAs de micro vesículas derivadas de leucemia y de células normales. Se han realizado análisis de 888 miRNAs y se ha encontrado que la mayoría de los miRNAs que están desregulados están involucrados en vías de señalización asociadas con leucemia, particularmente MAPK, y p53. Atendiendo a la translocación presente en leucemia la cual involucra al cromosoma 9, se ha examinado la función de 12 miRNAs entre los cuales se encuentra miR-7, estos se expresan en vesículas celulares derivadas de células k562 y en células K562, por lo que se proponen como potenciales blancos terapéuticos ¹⁴⁷. Otra mutación en leucemias, particularmente linfocítica crónica es la mutación de p53, se ha demostrado que existen varios miRNAs que dependen de p53 inducidos en respuesta al daño del DNA en leucemia linfocítica crónica (LLC), proponiendo el miRNoma para la identificación de la maquinaria respuesta de daño al DNA dependiente de p53 ¹⁴⁸. Además, se han realizado análisis de expresión de tumores provenientes de 16 pacientes de linfoma para analizar 851 miRNAs humanos, encontrado diferencia significativa en 133 miRNAs (> 2-fold; p<0.05)

entre linfoma e hiperplasia foliculares. Particularmente se determinó que miR-7 está aumentado en linfoma folicular y de manera muy interesante se determinó que la alta expresión fue asociada con una mejora en la respuesta a la quimioterapia ¹⁴⁹.

Por todo lo anterior conocer el papel del miR-7 y su posible efecto en la regulación del eje YY1/KLF4 en otros tipos de cáncer, como el LNH, resulta de gran interés, pues como ya se mencionó la participación del eje YY1/KLF4/miR-7 ha sido evaluado de manera independiente en otros tipos de cáncer.

6. Planteamiento del problema

Estudios recientes, realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que KLF4 juega un papel en LNH, evidenciando su capacidad pro-tumoral, además de que la alta expresión correlaciona con malignidad ⁵¹. Así también, como ya se mencionó, KLF4 puede activar o reprimir la transcripción de diferentes genes dependiendo del contexto ¹⁵⁰ y como resultado de esta alteración generar modificaciones en proliferación y diferenciación, es por ello que KLF4 se ha considerado como un elemento oncogénico en diferentes tipos de cáncer. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo y otros grupos han reportado que el factor de transcripción YY1 se encuentra altamente expresado en LNH específicamente en los subtipos folicular, difuso de células B grandes, así como linfoma de Burkitt. Recientemente hemos reportado que este factor de transcripción regula la expresión de KLF4 en líneas celulares de linfoma ⁵⁵.

Por otro lado, recientes publicaciones han posicionado a los miRNAs como un elemento regulatorio de la transcripción con especial importancia en cáncer, particularmente se ha demostrado que existe una expresión de patrones de miRNAs que permiten discriminar entre lo normal y cáncer, así como discriminar entre la subclasificación de tumores. Estos patrones de expresión diferencial también se han identificado en LNH y sus subclasificaciones. De manera particular, se ha reportado que el miR-7 es capaz de regular la expresión de KLF4 en cáncer de pulmón ¹⁵¹, y de manera muy interesante diversos reportes indican que también es capaz de inhibir la expresión de YY1 ⁸⁴. Lo que sugiere que miR-7 presenta una función antitumoral. Por lo que es factible pensar que miR-7 puede estar implicado en la linfomagénesis mediante la regulación de YY1 y KLF4 en LNH, así también que esta regulación tenga implicación en la

agresividad de esta enfermedad. En LNH se ha reportado una alta expresión de los factores de transcripción KLF4 y YY1, adicionalmente estudios han reportado una posible participación de miR-7 en la enfermedad, sin embargo, el mecanismo por el cual miR-7 participa en LNH no ha sido estudiada.

7. Preguntas de investigación

¿MiR-7 participa en la regulación de la expresión de KLF4 y YY1 en LNH?

¿La posible regulación de miR-7 en KLF4/YY1, participa en la capacidad de migración y quimioresistencia de la enfermedad?

¿La expresión de miR-7 correlaciona con supervivencia en pacientes con LNH?

8. Hipótesis

miR-7 regula negativamente la expresión de KLF4 y YY1 en LNH y esta regulación está implicada en la capacidad de migración y quimioresistencia de esta enfermedad.

9. Objetivos

9.1 Objetivo General

Evaluar la implicación de miR-7 en la regulación negativa de la expresión de KLF4 y YY1 en LNH, así como su participación en la malignidad de la enfermedad.

9.2 Objetivos particulares

1. Establecer la expresión de miR-7 y su posible implicación en la regulación de KLF4 y YY1 en líneas celulares de LNH.
2. Evaluar la participación de miR-7 en la regulación de YY1 y KLF4 en líneas celulares de LNH mediante plásmidos reporteros.
3. Determinar los patrones de migración y quimioresistencia en líneas celulares que presenten alta o baja expresión de miR-7.
4. Determinar la expresión de miR-7 en biopsias de pacientes con LNH y establecer la posible correlación que existe con la expresión de YY1/KLF4.

5. Mediante análisis bioinformático, comparar la expresión de miR-7 en pacientes y comparar con controles sanos, establecer la relación de la expresión de miR-7 con la supervivencia total de pacientes con LNH.

10. Materiales y métodos

Cultivo celular

Las líneas celulares de linfoma no Hodgkin: Ramos, Raji, DHL4 y 2F7, fueron adquiridas del ATCC (Bethesda MD), se cultivaron en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 Advanced (Gibco™ UK), suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco™ UK).

Extracción de RNA y Retro-transcripción

Se realizó la extracción de RNA de 2x10⁶ células de cada una de las líneas celulares mediante el uso del Kit MiRneasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA mensajero, se evaluó su calidad y se cuantificó usando el equipo Nanodrop (ThermoFisher), se tomaron 500 ng y se procedió a realizar la retro-transcripción con el uso del kit "MultiScribe Transcriptase Reverse" (Thermo Fisher). Una vez preparada la muestra de reacción siguiendo las instrucciones del proveedor, se sometió al termociclador para obtener el cDNA total de cada línea celular, se cuantificó el cDNA y se evaluó su calidad con el equipo Nanodrop (ThermoFisher), posteriormente se conservó a -80°C.

PCR-Tiempo Real

Se determinó la expresión de miR-7 y de los RNA mensajeros (mRNA) de KLF4 y YY1 en las líneas celulares de LNH, a partir de extractos de cDNA total obtenidos por kit miRneasy Mini Kit (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó el kit Universal Taqman Máster Mix II (Applied Biosystems) y se usaron sondas Taqman® para miR-7 (Hs06671652_g1), U6 (Hs00984809_m1), KLF4 (Hs00358836_m1), YY1 (Hs00998747_m1) GAPDH (Hs02786624_g1) de Applied Biosystems. La reacción se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor para una curva estándar, brevemente: 2 minutos a 50°C, posteriormente se 10 minutos a 95°C finalmente 40 veces se alternó ente

15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Como control de expresión constitutiva para miR-7 se usó U6 mientras que para KLF4 y YY1 se evaluó el mRNA de GAPDH. Se calculó el valor relativo de expresión de los genes y del miRNA utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$.

Western Blot

Las líneas celulares de LNH se cultivaron hasta una densidad de 1×10^6 células/pozo en 2 mL de medio de cultivo en placas de cultivo celular de 6 pozos, se recolectaron las células, posteriormente se lavaron con PBS frío y se lisaron usando el buffer mPer™ (ThermoFisher) y sometiendo a agitación fuerte en vortex durante 10 minutos posteriormente se centrifugo a 15,000 rpm durante 15 minutos, los extractos proteicos totales fueron cuantificados con un espectrofotómetro empleando el método de Lowry y posteriormente fueron desnaturalizados mediante la adición del buffer Laemli 2x (BioRad) y se hirvieron durante 10 minutos a 96°C. Una vez obtenidos los extractos proteicos desnaturalizados. Se realizó un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida a una concentración de 14%, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el equipo Trans-Blot turbo (Bio-rad). Después las membranas fueron bloqueadas durante 1 h en agitación constante con el buffer de bloqueo Intercept (Li-COR), una vez finalizada la incubación se retiró el buffer de bloque y se adicionaron los anticuerpos a los anticuerpos primarios dirigidos a proteínas YY1 (Novus Biologicals NBP2-67391 1:500), KLF4 (Novus Biologicals NBP1-83940 1:500) y GAPDH (Genetex GTX100118 1:500) se incubaron durante toda la noche en agitación constante a 4°C y en oscuridad. Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agitación con TBS-Tween 20 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario (LiCOR), el cual este acoplado a un fluoroforo IRDye(R), 680RD [Rojo]. Donkey anti rabbit IgG Secondary antibody (P/N: 926-68073) y con IRDye(R), 800CW [Verde]. Goat anti rabbit IgG Secondary antibody (P/N: 926-32211) de LI-COR Biosciences), por una hora. Finalmente se realizaron dos lavados de 5 minutos con TBS-tween20 0.1% y uno lavado con TBS y se revelaron utilizando el equipo Li-COR de Oddissey. Posteriormente se determinó la intensidad de expresión por densitometría de pixeles con el software ImageStudio Lite de Licor. Obteniendo

el cociente de la expresión proteica de interés sobre la proteína con expresión constitutiva endógena usada como control (GAPDH).

Muestras de pacientes (Tejidos)

Se incluyeron 43 biopsias de piezas quirúrgicas de pacientes diagnosticados con LNH, de los cuales 26 corresponden a linfoma folicular (LF) y 17 a linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). Las muestras se obtuvieron del Departamento de Patología del Hospital de Oncología, CMN S.XXI, IMSS y del Hospital General de México Eduardo Liceaga SSA.

Microarreglo de tejidos (MAT)

Las biopsias de pacientes diagnosticados con LNH se arreglaron por triplicado en un microarreglo de tejidos. Se realizaron tinciones de hematoxilina/eosina (H&E) para que posteriormente el Doctor Marco Antonio Duran Padilla, Jefe del Servicio de Patología del Hospital General de México “Eduardo Liceaga”, seleccionara áreas representativas del tumor, se tomaron estas áreas del denominado bloque donador y se transfirieron a un bloque limpio llamado bloque receptor, cada muestra de tejido se acomodó siguiendo la ubicación de un mapa que se realizó previamente **Figura 4**, esto se realizó en un microarreglador de tejidos semiautomatizado ATA-100, así se construyó el bloque arreglado del MAT. Se realizaron cortes de 4-5 μ del microarreglo con un micrótomo y se fijaron en laminillas de vidrio cargadas para su posterior análisis.

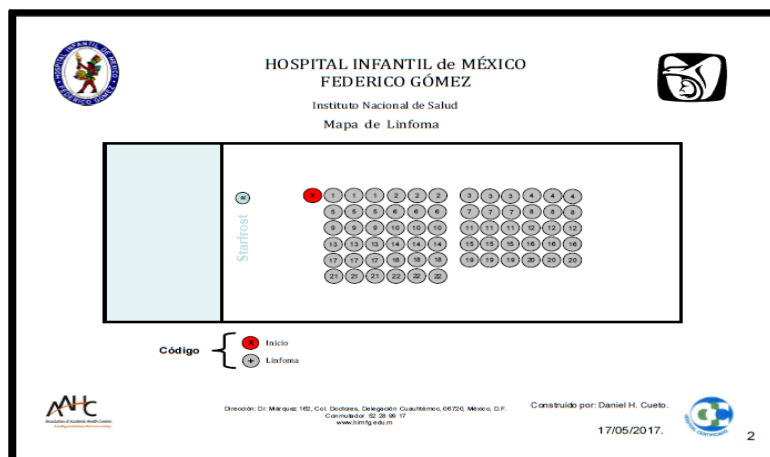


Figura 4. Esquema de microarreglo de tejido. Mapa esquemático para la generación y esquematización de los MAT

Hibridación in situ

Para realizar la hibridación *in situ*, se utilizó el kit XISH One step polymer-HRP Detection System for Xmatrix (Biogenex, California EUA) y se siguieron las indicaciones del proveedor. Se realizó la hibridación en el equipo automatizado Xmatrix de Biogenex (Biogenex, California EUA) utilizando una laminilla con el microarreglo previamente construido. Una vez terminada la hibridación se realizó el análisis de la laminilla por patología digital en el equipo ScanScope (Aperio, Leica Biosystems, Alemania). El cual cuenta con un software de análisis de expresión proteica en microarreglos de tejido en el que se puede determinar la intensidad de la expresión mediante densitometría de píxeles, asignando un valor numérico de manera automatizada con el cual se pudo determinar y evaluar la presencia del miR-7.

Inmunohistoquímica (IHQ) y análisis morfométrico.

Se realizaron tinciones de IHQ en cortes seriados de los MATs de 4 a 5 µm de espesor, previamente desparafinados e hidratados. La unión inespecífica de los anticuerpos se redujo al incubar con una solución de bloqueo al 2% de suero normal de cerdo en PBS durante 120 minutos. Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos contra YY1 (Novus Biologicals NBP2-67391 1:250) o KLF4 (Novus Biologicals NBP1-83940 1:250). Al día siguiente, las laminillas se lavaron y se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado, parte del kit GBI (Golden Bridge International Labs.), durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguida por una incubación con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) del mismo kit GBI (Golden Bridge International Labs.), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para la generación del color visible, se utilizó 3,3' tetra-hidrocloruro diaminobenzidina DAB, (Golden Bridge International Labs.), de uno a cinco minutos. La reacción se detuvo con agua y como medio de contraste se utilizó hematoxilina. Finalmente, los tejidos fueron deshidratados mediante el un tren de solventes con diferentes concentraciones de soluciones acuosas-alcohólicas, y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje. Las diferentes tinciones se analizaron utilizando un escáner automático de laminillas ScanScope (Aperio, Leica Biosystems, Alemania) que adicionalmente cuenta con un software de análisis de microarreglos de tejido en el que se puede

determinar la intensidad de la expresión, mediante conteo de píxeles, de las proteínas de interés de manera automatizada.

MTT

Se sembraron 50,000 células de cada línea celular, se incubaron durante 24 horas con CDDP (330 μ M) o con el vehículo DMSO como control y posteriormente se añadió el reactivo MTT, posterior a 4 horas se realizó la solubilización de las sales mediante el agente solubilizador incluido en el kit de proliferación celular I (MTT), (Sigma-Aldrich, MERK, Alemania), para posteriormente incubar durante una noche. Una vez que ocurrió la incubación se revela la placa mediante la cuantificación de la absorbancia en un equipo multi-lector de placas EnSpire (Perkin Elmer, Massachusetts EUA), a 620 nm.

Ensayos de migración en cámaras Transwell

Se utilizaron cámaras Transwell (Costar, ME. EUA) de 6 pozos e inicialmente se activó la membrana con la adición de 500 microlitros de medio de cultivo RPMI 1640 Advanced (GIBCO™), sin suero fetal bovino durante una hora a 37°C. Después de una hora, se añadió el medio con 0.5×10^6 células sobre la membrana y se realizaron movimientos “en ocho”, para una distribución adecuada. Dentro de la placa se añadió medio de cultivo RPMI 1640 Advanced con 10% de SFB. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Se determinó la cantidad de células sobre la membrana y en el medio de cultivo colocado debajo de la membrana en la placa, mediante la tinción con azul de tripano en un contador automatizado de células TCD10 (BioRad CA EUA).

Transfección de líneas celulares de LNH.

Se cultivaron 250,000 células en placas de 12 pozos, en 700 microlitros de medio de cultivo RPMI sin suplementar. Por otro lado, se preparó la mezcla del material genético de interés y 2.5 μ L de lipofectamina en 800 microlitros de medio sin suplementar, se agitó gentilmente y se incubó durante al menos 25 minutos. Posteriormente se añadió la mezcla de lipofectamina con el material genético y se incubó durante 5 horas a 37° C con agitación suave cada hora, posterior a este tiempo se cambió el medio por medio suplementado y se incubó durante 48 horas a 37 grados y 5% de CO₂. Finalmente se colectaron las células y se

determinó la luminiscencia en el multi-lector de placas enSpire (Perkin Elmer, Massachusetts EUA).

Plásmidos reporteros, Inhibidor y mimetizador de miR-7

Se utilizó el sistema “Lightswitch miRNA mimics and inhibitors” de SwitchGearGenomics (Active Motif, Shanghai), el cual consiste en un reportero que contiene la región 3’UTR de KLF4 y de YY1 por separado seguidos de un reportero de luciferasa. Consiste también en un inhibidor del miR-7 que permite hacer un “knock down” del miRNA por complementariedad, así como un mimetizador que permite generar una secuencia idéntica al miR-7 que permita el aumento sintético en la expresión del miRNA. La línea celular Raji fue trasfectada con estos plásmidos. En todos los casos se transfectó un 1 µg de reportero y 2 µg del mimetizador o inhibidor, respectivamente. Se incubaron durante 24 horas y posteriormente se determinó la luminiscencia con el multi-lector de placas enSpire (Perkin Elmer, Massachusetts EUA). Se realizó la cuantificación de proteína total mediante el método de Lowry, de las células tratadas y la luminiscencia determinada se dividió entre la proteína total cuantificada de las células tratadas a fin de normalizar la cantidad de células usadas en cada condición.

Inmunofluorescencia.

Se colocaron 10,000 células en 10µL de PBS, dos puntos por cada laminilla y fueron fijadas con formaldehído al 4%, se realizaron 3 lavados y se procedió a incubar con los anticuerpos anti-YY1 (Novus Biologicals NBP2-67391 1: 250), anti-KLF4 (Novus Biologicals NBP1-83940 1: 250), y el control de isotipo de IgG. Además, se utilizó el estreptavidina AlexaFluor 488 (Jackson-ImmunoResearch, West Grove, CA), EE. UU.) para la tinción fluorescente, y finalmente Vectashield-DAPI (Vector-Laboratory, Burlingame, CA, EE. UU.) para tinción de contraste y medio de montaje de la línea celular transfectadas con el INH o MIM-miR-7. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica TCS SP8x (Wetzlar, Alemania) y se analizaron con el software LAS X (Leica, Wetzlar, Alemania).

Fuentes de datos y análisis de expresión de miRNAs.

La expresión de miR-7 en LNH fue obtenida de la base de datos GEO oncomine, se utilizaron los conjuntos de datos identificados con el código GSE29493 el cual incluye 7 tejidos normales de amígdala y 147 tejidos de linfoma. Así como GSE10846, el cual contiene 7 pacientes de DLBCL vivos y 7 pacientes muertos, para la supervivencia general a 3, años todos los pacientes que reciben tratamiento con R-CHOP.

11. Resultados

11.1 La expresión de miR-7 correlaciona de manera negativa con la expresión de KLF4 y YY1 en líneas celulares de LNH.

Para conocer la posible correlación de expresión de miR-7 con la expresión de YY1 y KLF4 en diferentes líneas celulares de LNH, se evaluó mediante PCR en tiempo real la expresión del miRNA y los RNAm de los factores de transcripción. Se analizó la expresión de miR-7, así como el RNA mensajero de YY1 y KLF4 en las líneas celulares de LNH, Ramos, Raji, DHL4 y 2F7. Se determinó la expresión y se analizaron las veces de cambio determinadas por el método $\Delta\Delta Ct$. Los resultados obtenidos indican que las líneas celulares Raji y 2F7, tienen una expresión de miR-7 relativamente mayor en comparación a las líneas celulares Ramos y DHL4 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) (**Figura 5A**). Por otro lado, el análisis de la expresión de RNA mensajero de KLF4 (**Figura 5B**), y de YY1 (**Figura 5C**), muestra que la línea celular DHL4 tiene la mayor expresión de ambos factores de transcripción (* $p < 0.05$) en comparación con las otras líneas celulares analizadas.

Para conocer el comportamiento en conjunto de miR-7, YY1 y KLF4 se realizó un análisis de correlación r de Pearson de la expresión de miR-7 versus el mensajero de YY1 y KLF4, los resultados muestran que para YY1 existe una correlación negativa ($r = -0.6112$ $p = 0.38$) (**Figura 5E**), mientras que para KLF4, aunque no hay significancia estadística, se observa existe una ligera tendencia negativa. ($r = -0.2745$ $p = 0.72$). (**Figura 5D**) En conjunto, los datos obtenidos, nos permitieron seleccionar dos líneas celulares con alta expresión de miR-7 como

es Raji y con baja expresión de miR-7 que es DHL4, para los experimentos posteriores.

Para corroborar los resultados de la expresión del mRNA de YY1 y KLF4 en este estudio, se determinó la expresión de las proteínas YY1 y KLF4 por Western blot, y se determinó la intensidad de expresión por densitometría de píxeles (**Figura 5F y 5G**).

Los resultados muestran mayor expresión de YY1 en las líneas celulares Ramos y DHL4 en comparación con las líneas celulares Raji y 2F7, mostrando una diferencia estadísticamente significativa para Raji vs DHL4 ($*p < 0.05$) (**Figura 5G**). Resultados similares se observaron para la expresión de KLF4, donde las líneas celulares Raji y 2F7 tienen una menor expresión comparada a Ramos y DHL4 ($*p < 0.05$). (**Figura 5F**). Las líneas celulares Raji y DHL4 muestran los niveles de expresión con mayor diferencia en la expresión de miR-7 así como KLF4 y YY1, por lo que fueron seleccionadas para experimentos posteriores.

Estos resultados muestran que existe una correlación inversa en la expresión de miR-7 y los factores de transcripción YY1 y KLF4 en líneas celulares LNH.

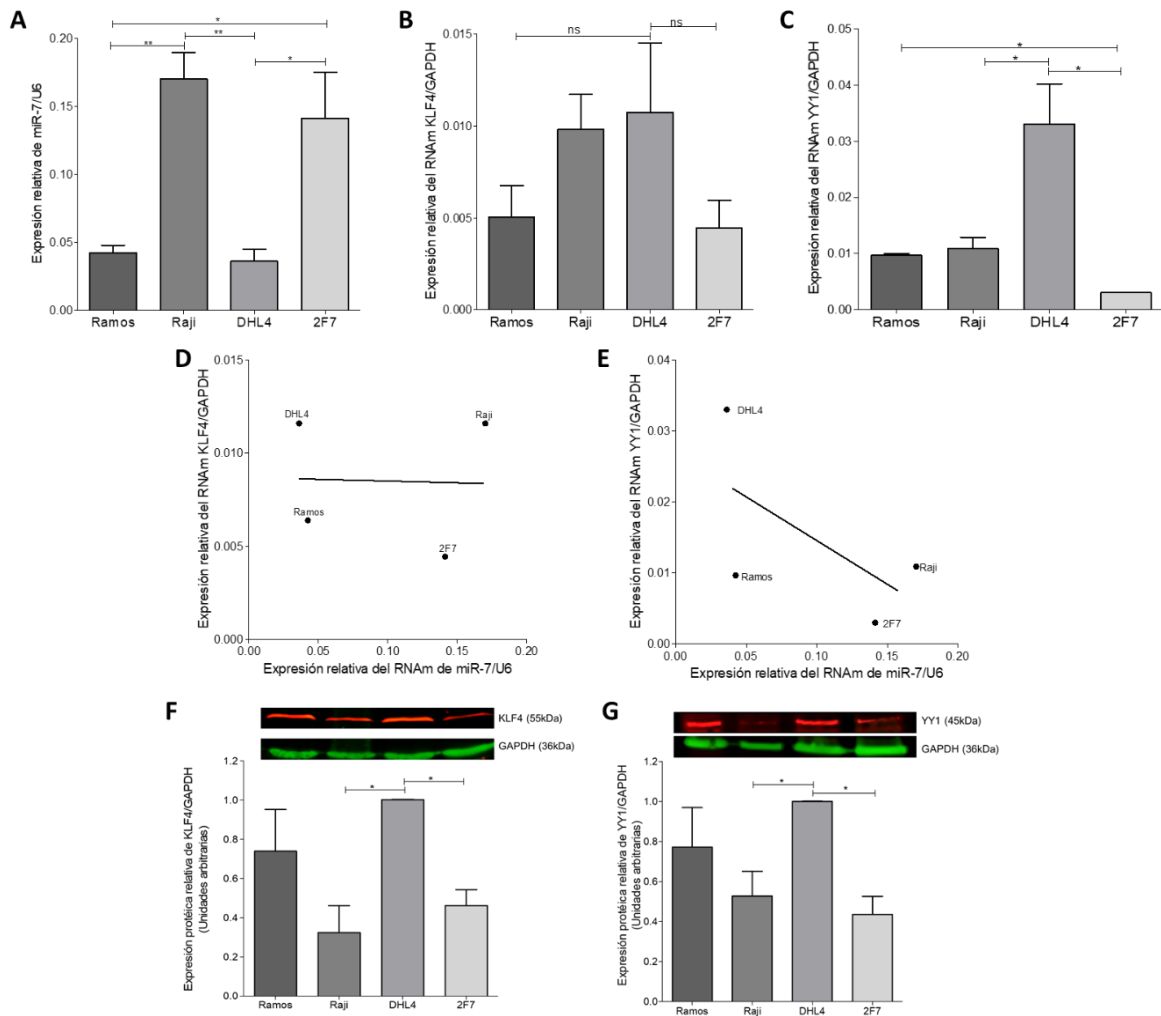


Figura 5. Determinación de la expresión de miR-7, KLF4 y YY1, en líneas células de LNH.

A) Se determinó la expresión de miR-7 en líneas celulares de LNH, mediante PCR en tiempo real usando sonda Taqman para miR-7 así también, se utilizó U6 como control de expresión constitutiva endógena. Se realizaron tres triplicados de cada experimento y se evaluó la expresión relativa mediante el método $\Delta\Delta Ct$, encontrando diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$). **B)** y **C)**, se determinó la expresión mediante PCR en tiempo real del RNAm de KLF4 y YY1 y de GAPDH usado como control de expresión constitutiva endógena. Tres triplicados de cada experimento fueron realizados y se determinó el nivel de expresión usando el método $\Delta\Delta Ct$, encontrando diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de YY1. (* $p < 0.05$). **D)** Se realizaron análisis de correlación de Pearson, de la expresión de miR-7 vs **D)** KLF4 y vs **E)** YY1. Se evaluó mediante Western Blot la expresión relativa de **F)** KLF4 y **G)** YY1, Las líneas rojas indican la expresión proteica de KLF4 y YY1 según se indique, mientras que en verde se encuentra la expresión proteica de GAPDH. Tres experimentos independientes fueron realizados y se evaluó por densitometría de píxeles la expresión relativa de las proteínas (Gráficas inferiores). (* $p < 0.05$).

11.2 miR-7 regula negativamente la expresión de KLF4 y YY1 en líneas celulares de LNH.

Como ya se mencionó en la introducción, estudios previos han reportado que miR-7 regula de manera negativa la expresión de YY1¹⁵² y KLF4⁸³. Por lo que en este estudio analizamos mediante análisis bioinformáticos, si existen sitios de unión para miR-7 en las regiones 3'UTR de KLF4 y de YY1 usando la base de datos miRtarbase¹⁵³ (disponible en mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw), encontrando al menos un sitio de unión en cada una de las regiones 3'UTR de ambos factores de transcripción (**Figura 6 A**).

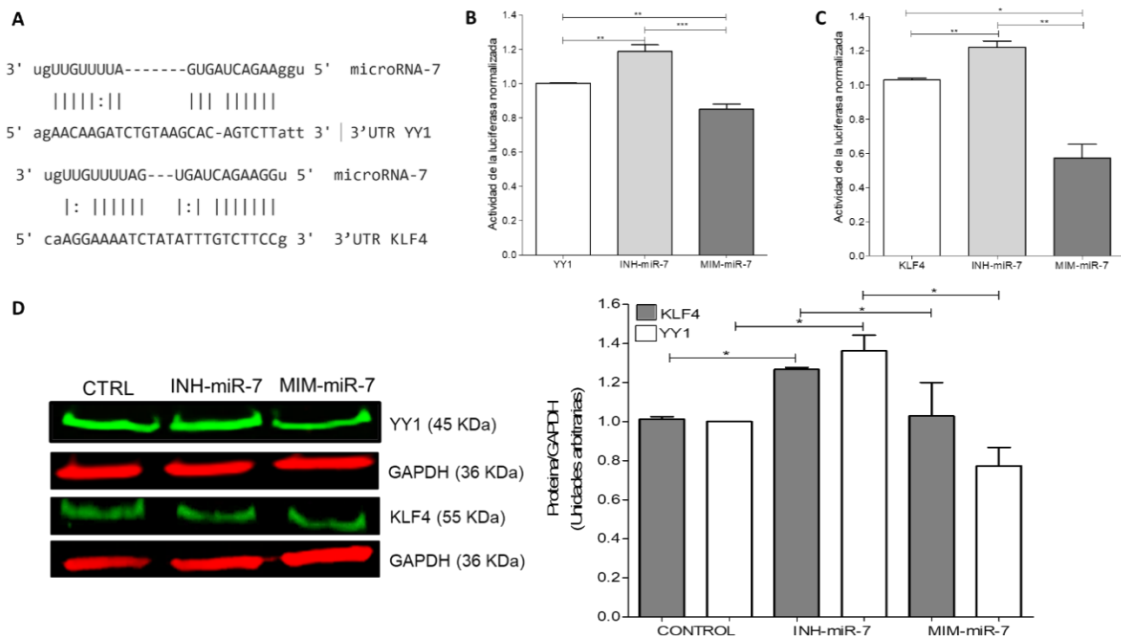
Para confirmar si miR-7 es capaz de regular transcripcionalmente a YY1 y KLF4, se realizaron ensayos de plásmido reportero. Para ello se utilizó un mimetizador de miR-7 (MIM-miR-7) que permite aumentar su expresión, así como un inhibidor de miR-7 (INH-miR-7) el cual disminuye la expresión por complementariedad. Adicionalmente se utilizaron plásmidos que contienen la región 3'UTR de KLF4 y YY1 y como gen reportero contenían luciferasa. Los resultados obtenidos muestran que en comparación con el control el cual contiene solo el plásmido reportero, el mimetizador de miR-7 disminuyó la señal del reportero tanto para YY1 (**Figura 6B**) como para KLF4 (**Figura 6C**) mientras que el inhibidor de miR-7, fue capaz de aumentar la expresión de ambos factores de transcripción. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ respectivamente).

Con el propósito de corroborar el efecto del inhibidor o mimetizador de miR-7 en el reportero que contiene las regiones 3'UTR de los factores de transcripción KLF4 y YY1, evaluamos la expresión proteica, mediante la técnica de Western blot la expresión de ambos factores de transcripción. El resultado observado fue consistente con lo previamente mostrado, es decir se observa una importante disminución en ambos factores de transcripción cuando las células son tratadas con un mimetizador del miR-7, mientras que se observa un aumento significativo cuando son tratadas con el inhibidor de miR-7 (* $p < 0.05$) comparado con el control. Estos resultados demuestran la participación del miR-7 en la regulación de YY1 y KLF4 (**Figure 6D**).

Con la finalidad de validar los resultados anteriores y confirmar la participación del miR-7 en la regulación de ambos factores de transcripción, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en una línea celular de LNH. El análisis de

expresión proteica por inmunofluorescencia permitió evaluar si el tratamiento con un mimetizador o inhibidor del miR-7, induce la disminución o aumento de la proteína respectivamente. Se prepararon laminillas de la línea celular Raji posterior a la transfección con el inhibidor o mimetizador, así como un control (scramble). Los resultados obtenidos muestran una importante participación del sistema de inhibidor (INH-miR-7) y mimetizador (MIM-miR-7), del miR-7, observando que el mimetizador fue capaz de disminuir la expresión de ambos factores de transcripción, mientras que el inhibidor tiene produce un aumento significativo en la expresión con mayor énfasis en YY1. (Figure 6E).

Estos resultados en conjunto nos permiten concluir que el miR-7 es capaz de regular la expresión de KLF4 y YY1 mediante unión a su región 3'UTR.



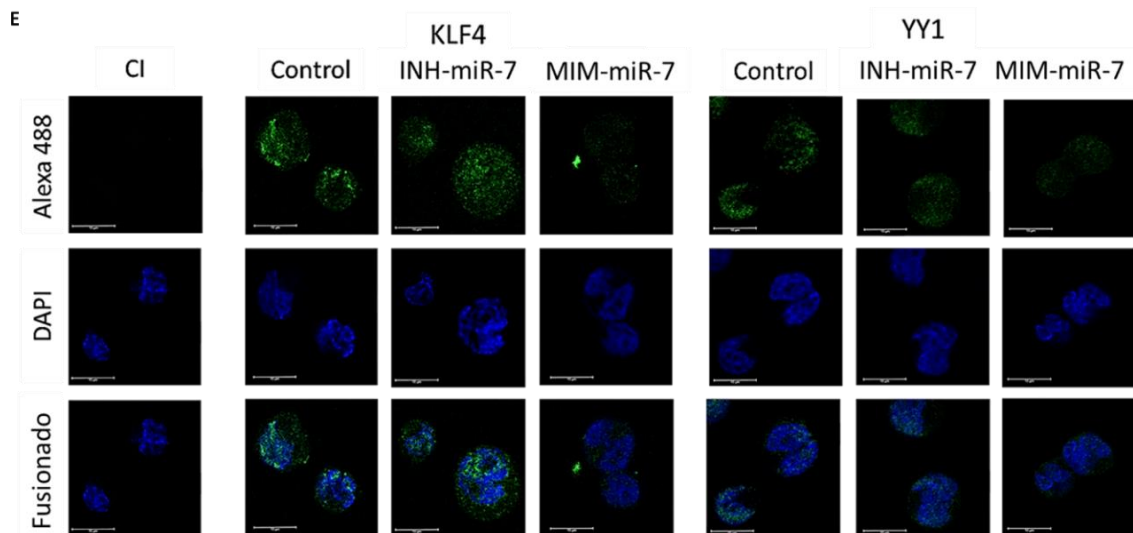


Figura 6. miR-7 regula la expresión de KLF4 y YY1 mediante la unión a su región 3' UTR. **A)** Análisis de sitios de unión de miR-7 en las regiones 3' UTR de KLF4 y YY1, mediante la base de datos miRtarbase. **B)** La línea celular Raji fue previamente co-transfectada con un inhibidor (INH) o un mimetizador (MIM), de miR-7, y con el plásmido reportero que contiene el gen de luciferasa precedido por la región 3' UTR de YY1 **B)** y KLF4 **C)**. La presencia del INH-miR-7 incrementa la expresión de KLF4 y YY1 (** $p < 0.001$), mientras que el MIM-miR-7 inhibe su expresión (** $p < 0.001$), respectivamente. **D)** Arriba, Western blot para KLF4 y YY1 fue realizada posterior al tratamiento con el INH-miR-7 o MIM-miR-7 o un control. Abajo. Se realizó un análisis densitométrico de la expresión de KLF4 y YY1 de tres experimentos independientes encontrando diferencia estadísticamente significativa (* $P < 0.05$). **E)** Se realizó la evaluación de la expresión de KLF4 y YY1 mediante inmunofluorescencia en la línea celular Raji, se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes.

11.3 MiR-7 juega un papel en la capacidad de migración y quimioresistencia en líneas celulares de LNH.

Con la finalidad de evaluar el papel que juega miR-7 en los procesos de migración y quimioresistencia, se seleccionaron las líneas celulares de LNH con mayor y menor expresión basal de miR-7, Raji y DHL4 respectivamente. Se realizaron los ensayos de migración en cámaras Transwell. Los resultados obtenidos muestran que la línea celular DHL4 tiene un mayor índice de migración en relación con la línea celular Raji (** $p < 0.001$ * $p < 0.05$). (**Figura 7A**). Lo cual sugiere que la baja expresión de miR-7 y su correlación con la expresión de YY1 y KLF4 podría estar relacionada con una mayor capacidad de migración. Otra de las características evaluadas fue la quimioresistencia, para lo cual se realizaron ensayos de inhibición de la proliferación mediante MTT, en las líneas celulares

Raji y DHL4 tratadas o no durante 24 horas, con un agente quimioterapéutico cis-diaminedicloroplatino (II) (CDDP). Los resultados obtenidos demostraron que la línea celular Raji presenta un bajo índice de proliferación en comparación con DHL4 después del tratamiento con CDDP ($*p<0.05$), (**Figura 7B**) lo que indica que la línea celular DHL4 que presentan bajos niveles de miR-7 y niveles elevados de YY1 y KLF4, muestra mayor quimioresistencia, permitiéndonos sugerir una posible participación de miR-7 en este comportamiento, mediante la regulación negativa de YY1 y KLF4.

Para corroborar la participación de miR-7 en la migración y quimioresistencia mediante la regulación de YY1 y KLF4 en LNH, se transfectaron las líneas celulares Raji que muestra una elevada expresión de miR-7 y la línea celular DHL4 que muestra una expresión disminuida de miR-7, con un inhibidor de miR-7 (INH-miR-7) o con un mimetizador del miR-7 (MIM-miR-7). Posterior a la transfección se realizó un ensayo de migración en ambas líneas celulares. Los resultados muestran, que las células transfectadas con el inhibidor de miR-7 duplica su capacidad de migración en comparación con las células transfectadas con el control ($*p<0.05$), mientras que la transfección con el MIM-miR-7 no genera alteraciones en la migración relativa (**Figura 7C**), por otro lado, la línea celular DHL4, tiene una disminución de la capacidad de migración posterior a la transfección con el MIM-miR-7 ($*p<0.05$) (**Figure 7D**).

Se evaluó la capacidad de quimioresistencia posterior a la transfección con un inhibidor y un mimetizador de miR-7 en las líneas celulares Raji y DHL4- (**Figuras 7E y 7F**). Los resultados muestran que la línea celular Raji al ser transfectada con el inhibidor de miR-7, presentan una mayor la viabilidad celular en comparación con las células no transfectadas, mientras que la transfección con el mimetizador disminuye la viabilidad celular relativa respecto al control ($*p<0.05$) (**Figure 7E**). La transfección de la línea celular DHL4 con un mimetizador del miR-7, resulto en una viabilidad celular similar al control, sin embargo, la transfección con el INH-miR-7, promueve un aumento en la viabilidad celular relativa.

Estos resultados nos permiten concluir que miR-7 puede participar en la migración y resistencia a la quimioterapia en líneas celulares de LNH.

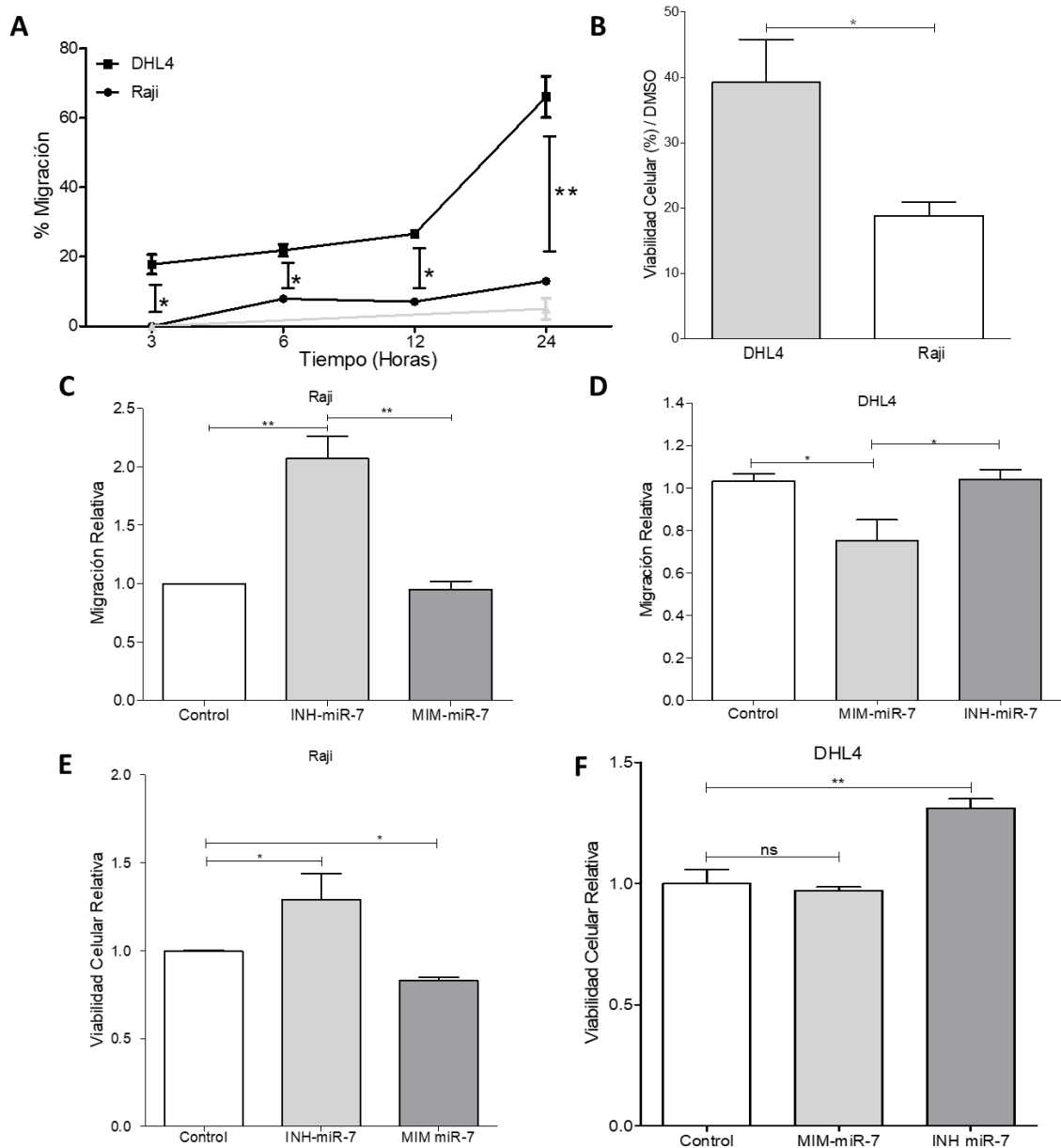
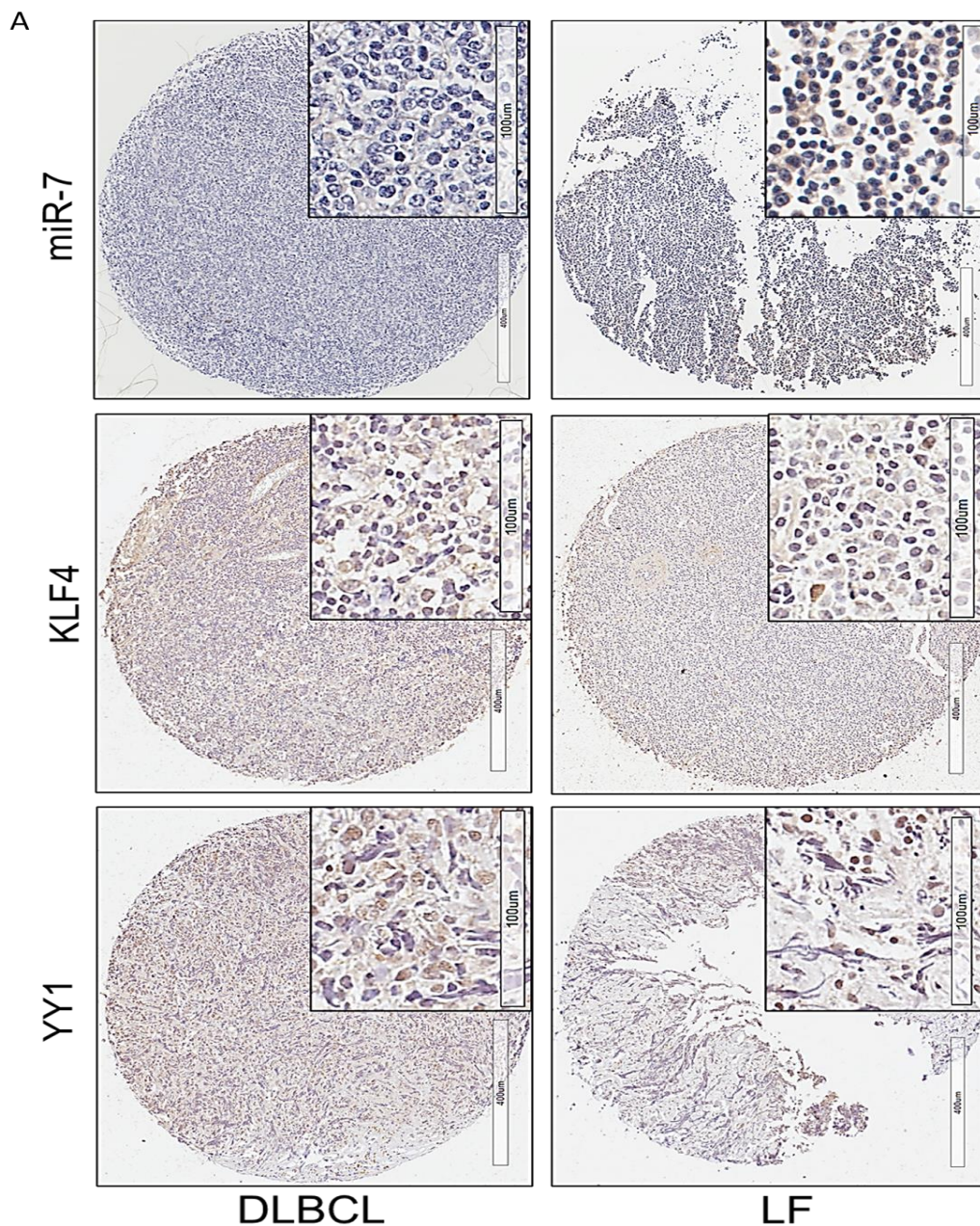


Figura 7. miR-7 juega un papel en la migración y la quimioresistencia en las líneas celulares de NHL. A) Ensayo de migración en cámaras Transwell™. El porcentaje del número total de células se determinó en las células Raji y DHL4 a las 3, 6, 12 y 24 horas. (* p <0,05, ** p <0,001). **B)** La quimioresistencia se evaluó mediante la determinación de la viabilidad celular por el método MTT, después del tratamiento con CDDP (330 µM). Se informó el porcentaje de viabilidad para cada línea celular. Para las líneas celulares **C)** Raji (** p<0.01) y **D)** DHL4 (p<0.05), se realizó el ensayo de migración en la línea celular posterior a la transfección con el INH-miR-7 o MIM-miR-7. Se realizó el ensayo de viabilidad celular para las líneas celulares **E)** Raji transfectada con MIM-miR-7 (* p <0,05) y con el INH-miR-7 (* p <0,05). y de **F)** DHL4 transfectadas con el MIM-miR-7 y con INH-miR-7 (**(p<0.01), respectivamente. Se evaluó la quimioresistencia. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes.

11.4 La expresión de miR-7 correlaciona de manera negativa con la expresión de KLF4 y YY1 en biopsias de pacientes con LNH.

Para corroborar nuestros hallazgos en líneas celulares de LNH y establecer la importancia clínica de miR-7, se analizó la expresión de miR-7 mediante hibridación *in situ*, así como de YY1 y KLF4 por inmunohistoquímica en un microarreglo de tejidos de pacientes con LNH (**Figura 8A**). Se analizó la expresión mediante patología digital utilizando el equipo Aperio de ScanScope (Wetzlar Alemania). Los resultados muestran que existe un patrón de expresión inverso entre la expresión de miR-7 y la expresión de KLF4/YY1, (***) $p < 0.001$) (**Figure 8B-E**).



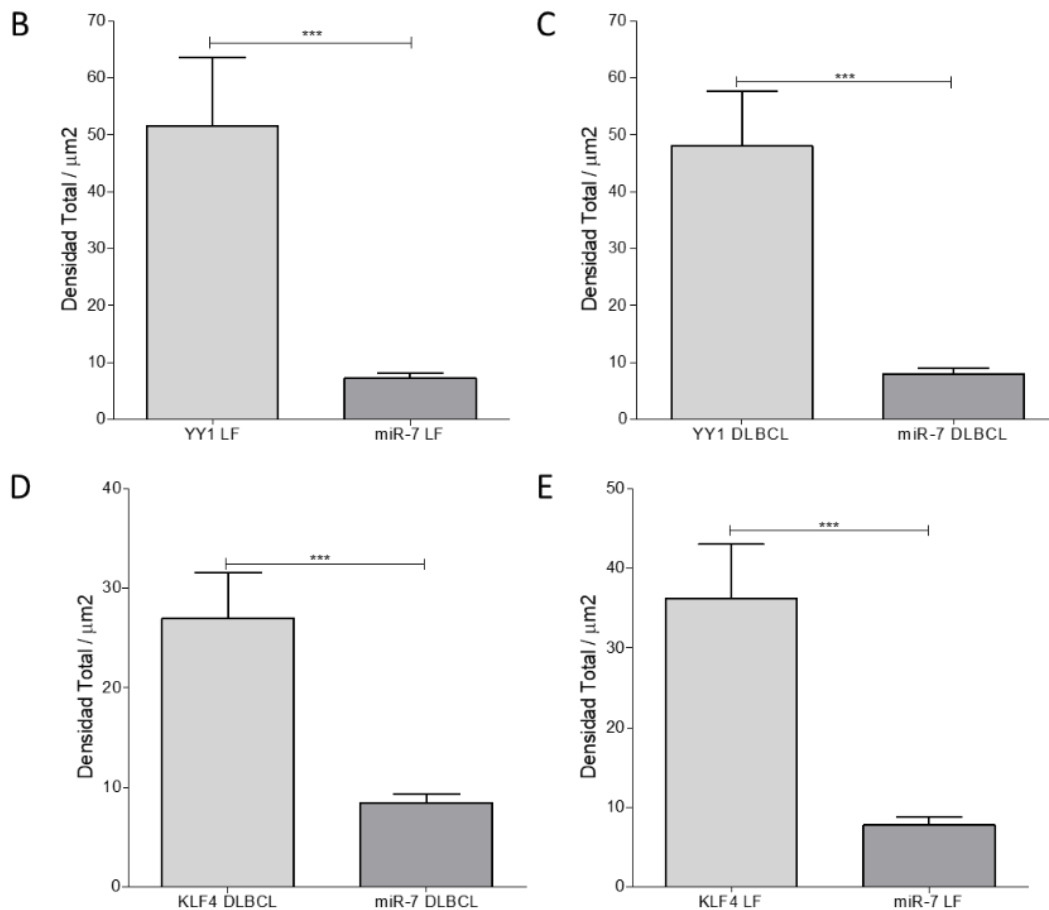


Figura 8. Expresión de miR-7, KLF4 y YY1 en tejidos de LNH. A) Micrografías representativas de la determinación de la expresión de KLF4 y YY1 por inmunohistoquímica, así como de miR-7 por hibridación *in situ* en un microarreglo de tejidos de pacientes con LNH. El recuadro es a un aumento de 4X, mientras que los recuadros pequeños tienen un aumento de 40X. **B-E)** Se graficó la densidad de expresión de miR-7, YY1 y KLF4 (Densidad total/ μm^2), en biopsias de pacientes con LNH de subtipo Difuso y Folicular. Y se compararon las diferentes expresiones para cada subtipo ($*p < 0.001$).

Para determinar si este resultado era estadísticamente significativo, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la expresión de miR-7 y la expresión de YY1 o KLF4, en las biopsias identificadas como DLBCL y LF en los microarreglos de tejidos. Los resultados obtenidos indican que para DLBCL existen una correlación negativa de KLF4 vs miR-7 ($r = -0.4454$, $p = 0.0106$), así como para YY1 vs miR-7 ($r = -0.3415$, $p = 0.0301$) (**Figura 9A y 9B**). Mientras que, para linfoma folicular, los resultados obtenidos indican que KLF4 vs miR-7 tiene una correlación negativa ($r = -0.5229$, $p = 0.0180$), al igual que miR-7 vs YY1 cuyos resultados también evidencian una correlación negativa ($r = -0.4248$, $p = 0.0385$) (**Figura 9C y 9D**). **Estos resultados muestran que existe una correlación**

inversa en la expresión del miR-7 y los factores de transcripción YY1 y KLF4 en biopsias de pacientes con Linfoma folicular

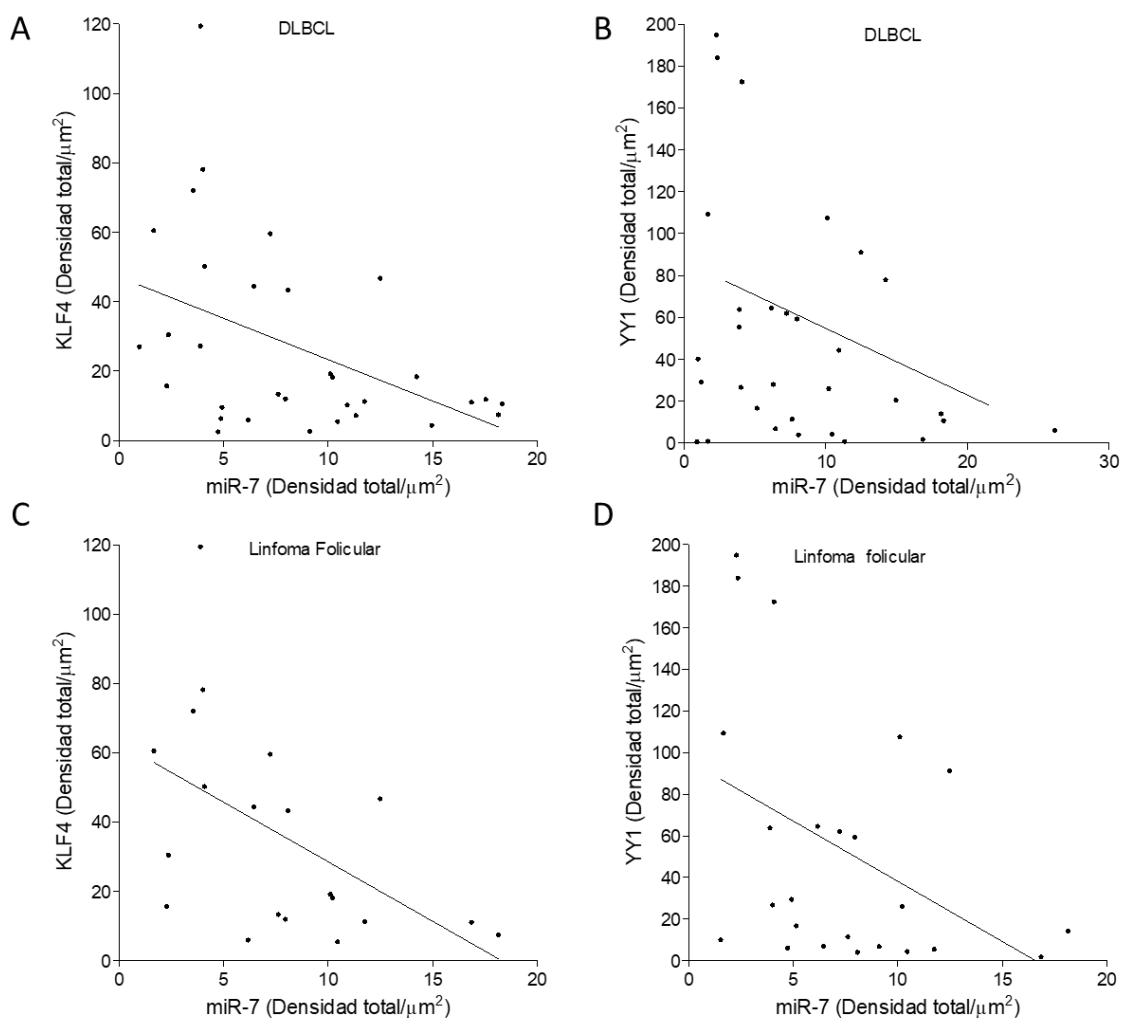


Figura 9. Correlación negativa de la expresión de miR-7 vs YY1 y KLF4 en tejidos de LNH.

Se realizó un análisis de correlación de expresión de miR-7 vs YY1/KLF4 en biopsias de pacientes con LNH. Se analizó mediante correlación de Pearson la de expresión entre los factores de transcripción YY1/KLF4 y miR-7. **A)** KLF4 vs miR-7 en linfoma difuso ($r=-0.4454$ $p=0.0106$), **B)** YY1 vs miR-7 en Linfoma Difuso ($r=-0.3415$ $p=.0301$). **C)** KLF4 vs miR-7 en Linfoma folicular ($r=-0.5229$ $p=0.0180$), **D)** YY1 vs miR-7 en Linfoma folicular ($r=-0.4248$ $p=0.0385$).

11.5 La expresión de miR-7 se encuentra disminuida en tejidos de LNH.

Para evaluar la importancia clínica de miR-7 en LNH, se evaluaron sets de datos, mediante la plataforma GEO (NCBI). Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de miR-7 es significativamente disminuida en LNH, en comparación con tejidos ganglionares usados como control ($***p<0.001$) (**Figure 10A**).

Adicionalmente, comparamos los valores de expresión de miR-7 en tejidos de linfoma provenientes de pacientes con LNH subtipos DLBCL y LF comparados con los niveles determinados en Linfocitos B de centro germinal no malignos. ($***p<0.001$ $*p<0.05$) (**Figure 10B**). Encontrando una mayor expresión en los Linfocitos no malignos. Adicionalmente al analizar la expresión de miR-7 en tejidos tumorales se determinó que correlaciona con una mejor supervivencia total en pacientes con DLBCL ($***p<0.001$) (**Figure 10C**). Finalmente, un análisis de supervivencia Kaplan Meier, permite identificar la supervivencia en pacientes con miR-7 positivo tiene un mayor porcentaje de supervivencia en comparación con pacientes con miR-7 negativo ($p<0.001$) (**Figure 10D**)

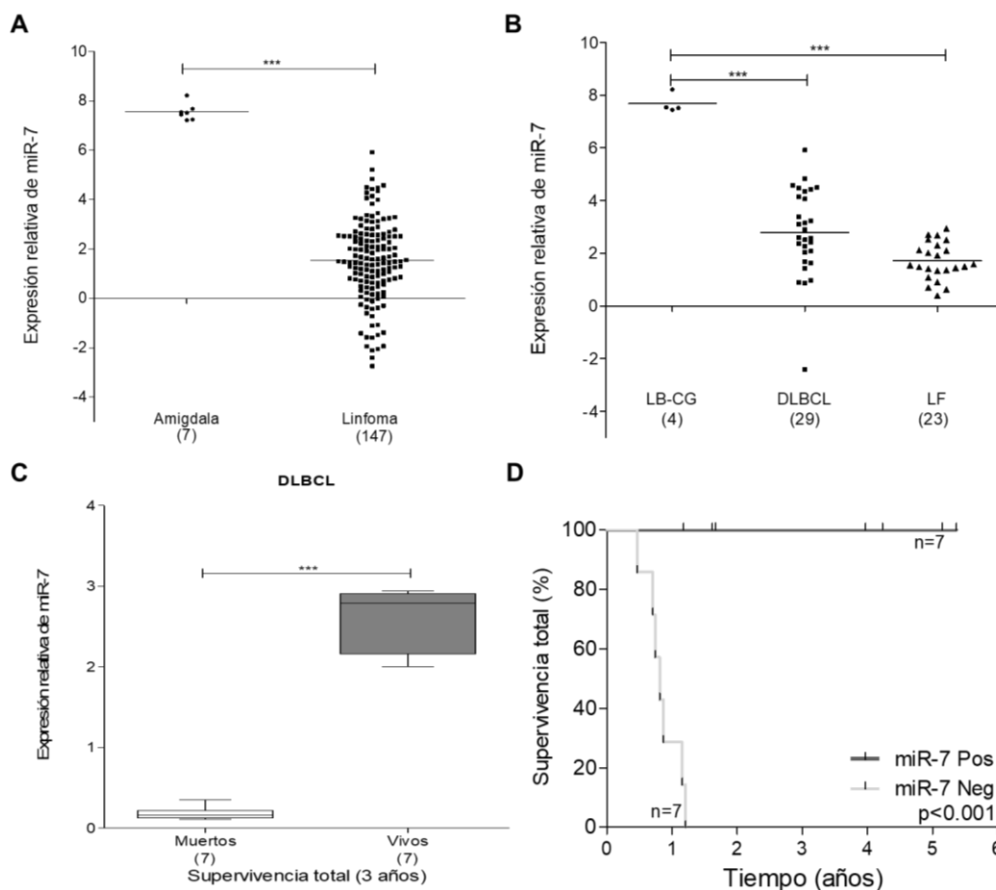


Figura 10. La expresión de miR-7 está disminuida en tejidos de linfoma. A) La expresión de miR-7 en el linfoma de células B está regulada a la baja en comparación con tejido de amígdalas normal ($*** P <0,001$), **B)** La expresión de miR-7 se encuentra disminuida en DLBCL y FL en comparación con las células B GC normales ($***P<0,001$). Datos obtenidos de GEO: GSE29493 **C)** La expresión de miR-7 está disminuida en pacientes muertos en comparación con pacientes vivos atendiendo a la supervivencia global Datos obtenidos de GEO: GSE31312 ($***P<0.001$). **D)** La supervivencia total en pacientes con miR-7 positivo se encuentra relacionada directamente con una mayor supervivencia total en comparación con pacientes con miR-7 negativo ($p<0.001$).

12. Discusión de Resultados

Diversos estudios han demostrado que los miRNAs tiene un papel fundamental en varios procesos biológicos, tales como proliferación, muerte celular, ciclo celular. Particularmente en el contexto de cáncer, la alteración de la expresión de miRNAs se ha descrito como un factor importante en la progresión e iniciación del cáncer, por lo que han sido propuestos como parte del desarrollo de los diversos tipos de malignidades ¹⁵⁴. Uno de los miRNAs que se ha relacionado de manera importante con cáncer es miR-7 ¹³⁷. Específicamente se ha demostrado que tiene capacidad de actuar regulando de manera negativa a los factores de transcripción KLF4 ⁸³ en cáncer de mama y YY1 en cáncer colorrectal ¹⁵².

El análisis de expresión de KLF4 y YY en biopsias de pacientes diagnosticados con LNH, han permitido establecer que ambos factores de transcripción desempeñan un papel fundamental en la linfomagénesis ^{51,85}, además de que el aumento en la expresión de estos ha sido relacionado directamente con un mal pronóstico⁵¹

Particularmente en linfoma de Burkitt nuestro grupo de investigación ha descrito que el aumento en la expresión de KLF4 correlaciona directamente con una pobre sobrevida en pacientes pediátricos ⁸⁰, mientras que en biopsias de pacientes con DLBCL y LF la expresión de KLF4 correlaciona de manera positiva con la expresión de YY1 ⁵⁵, aunado a esto diversos reportes han señalado que YY1 participa en la progresión tumoral del LNH ⁸⁹. Adicionalmente y en concordancia con estos reportes, reportamos por primera vez que en el contexto de LNH, YY1 es capaz de regular transcripcionalmente a KLF4, lo cual podría explicar la correlación positiva en la expresión y además el aumento de la expresión ambos factores de transcripción en la enfermedad. Con la premisa de que miR-7 es capaz de regular a ambos factores de transcripción en otras malignidades y que existe una regulación transcripcional entre estos, resulta fundamental el establecimiento en el contexto de LNH. Por lo que en este estudio se evaluó la participación de miR-7 en la regulación de la expresión de KLF4 y YY1 en LNH y su posible papel en la malignidad mediada por la regulación en la expresión de ambos factores de transcripción.

Inicialmente, se determinó mediante RT-PCR, la expresión de miR-7 (**Figura 5A**) y el RNA mensajero de KLF4 (**Figura 5B**) y YY1 (**Figura 5C**), en líneas celulares de LNH. Como se puede observar en la figura 5, los niveles de expresión de KLF4 y YY1, tienen un comportamiento de expresión similar, lo cual es congruente con lo previamente descrito, adicionalmente los resultados obtenidos muestran niveles de expresión que sugieren una expresión inversa de miR-7 y el factor de transcripción YY1 y KLF4. Adicionalmente se realizó un análisis de correlación de r de Pearson y en donde se evidencio una correlación inversa de miR-7 con KLF4 (**Figura 5D**) y YY1 (**Figura 5E**). Estos resultados son consistentes con publicaciones en las cuales se ha demostrado que el miR-7 es capaz de regular negativamente a KLF4⁸³ y a YY1¹⁵² en cáncer de mama y colorrectal respectivamente y sientan las bases para que esta regulación ocurra también en LNH.

Considerando que el mecanismo de acción por el cual los miRNAs inhiben la traducción de RNA mensajero, cuyo efecto final se refleja en los niveles de expresión de las proteínas, se evaluó la expresión proteica de KLF4 y YY1, mediante Western blot en diferentes líneas celulares de LNH. De manera interesante los resultados muestran que la expresión de KLF4 (**Figura 5F**) y YY1 (**Figura 5G**) tienen un patrón de expresión inverso al de la expresión de miR-7 (**Figura 5A**), lo cual refuerza el posible efecto regulatorio del miRNA sobre los factores de transcripción.

Para confirmar que el miR-7 este participando directamente en la regulación de los factores de transcripción, se realizó un análisis bioinformático en el que se buscaron posibles sitios de unión para el miRNA en los promotores de KLF4 y YY1, los resultados evidenciaron al menos un sitio de unión en cada promotor (**Figura 6A**). Adicionalmente se utilizó un sistema de plásmido reportero, que contenía las regiones 3'UTR de KLF4 o YY1, los resultados obtenidos confirmaron la predicción realizada por el análisis bioinformático ya que se demostró que la transfección con el MIM-miR-7 promueve un aumento en la expresión de miR-7 y una disminución de la señal de Luciferasa, mientras que INH-miR-7 disminuye la expresión de miR-7 y esto genera un aumento en la señal de luciferasa (**Figura 6B y C**). En conjunto estos resultados son consistentes con lo reportado en cáncer de mama⁸³ y cáncer colorrectal¹⁵²; en

donde se describe la participación de miR-7 como regulador negativo de KLF4 y YY1 respectivamente.

Una vez confirmado el rol de miR-7 como regulador negativo de KLF4/YY1, se procedió a evaluar si esta regulación impactaba en el comportamiento de la enfermedad, dado que ambos factores participan directamente en características como resistencia al tratamiento y migración^{51,85}, evaluamos la participación de miR-7 en la capacidad de migración, así como de resistencia a la quimioterapia en líneas celulares de LNH. De manera muy interesante la expresión basal diferencial de miR-7 se relacionó de manera directa con la capacidad de migración celular, así como con la quimioresistencia, encontrando que la línea celular Raji, la cual según nuestros resultados tiene una expresión elevada de miR-7, tiene una capacidad migratoria reducida, así como una menor resistencia a la quimioterapia. Por otro lado, la línea celular DHL4, la cual presenta una expresión disminuida de miR-7 presenta un mayor porcentaje de migración, así como mayor resistencia a la quimioterapia, representada por una mayor viabilidad posterior al tratamiento **(Figura 7A y B)**.

Por otro lado, se ha demostrado que la reversión de la alteración en la expresión de un miRNA específico mediante miRNAs sintéticos o antagonistas puede normalizar la red de genes reguladores y las vías de señalización, revertir el fenotipo de células tumorales¹²⁸, inhibir la proliferación de células tumorales, e inhibir procesos como invasión tumoral y metástasis¹²⁷. Por lo que se procedió a evaluar el efecto de una reversión en la expresión de miR-7.

Los resultados obtenidos muestran que la transfección de la línea celular Raji con el INH-miR-7, induce un mayor aumento en la capacidad de migración y en la viabilidad celular posterior al tratamiento **(Figura 7C y 7E)**, lo cual indica una mayor quimioresistencia en comparación con el control, mientras que la transfección con MIM-miR-7, no altera la viabilidad celular de manera significativa. Sin embargo, en la línea celular DHL4 se observa que la transfección con el MIM-miR-7 disminuyó la capacidad de migración **(Figura 7D)**, pero no genera cambios en los niveles de viabilidad celular posterior al tratamiento mientras que el INH-miR-7 aumenta los valores de viabilidad celular relativa **(Figura 7F)**. Estos resultados podrían ser explicados basados en los niveles de expresión de los factores de transcripción blancos de este miRNA, KLF4 y YY1, determinados previamente **(Figura 5F y 5G)**, ya que como se

observa DHL4 tiene los niveles más altos de expresión de ambos, los cuales a su vez podrían estar ejerciendo un efecto en la quimioresistencia probablemente por el rol de YY1 en proteínas tales como MDR1 ⁵². Es por lo que mayores dosis de CDDP y otros fármacos deben ser evaluados. Estos resultados son congruentes con el modelo propuesto en el que miR-7 puede regular la expresión de YY1 y su papel en la malignidad de LNH.

YY1 es una proteína con dedos de zinc ubicuamente expresada e implicada en un gran número de procesos biológicos como desarrollo, proliferación, diferenciación y apoptosis¹⁵⁵. Su función específica depende de su localización y se determina por su red de interacción con otras proteínas, DNA y RNA ¹⁵⁶. YY1 es crítico en la regulación del desarrollo temprano de linfocitos B ¹⁵⁷. Así también YY1 es crítico en tejidos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, donde se lleva a cabo la maduración y expansión de linfocitos B ¹⁵⁸. Y donde se pueden originar varios subtipos de LNH como el DLBCL y Folicular. De esta manera, YY1 ha sido implicado en varias malignidades hematológicas como leucemia y LNH ¹⁵⁹. Por lo anterior YY1 ha sido propuesto como un importante biomarcador y un potencial blanco terapéutico en LNH ¹⁶⁰. Se ha reportado que muestras de DLBCL y LF muestran elevados niveles de expresión de YY1 y esto correlaciona con una pobre supervivencia de los pacientes ⁸⁶. In vitro YY1 puede promover la transformación de linfocitos B y contribuir a la progresión tumoral ⁸⁹ o bien contribuir a la quimioresistencia del LNH ¹⁶¹. Por otro lado, KLF4, como ya se mencionó brevemente puede activar o reprimir diferentes genes ¹⁶². En el caso particular de linfocitos pre-B juega un importante papel en la regulación del ciclo celular ⁷⁰. Recientes estudios han reportado que la expresión de KLF4 correlaciona con una pobre supervivencia y respuesta al tratamiento en pacientes pediátricos con linfoma de Burkitt ⁵¹ y también se ha reportado que KLF4 regula el ciclo celular en malignidades hematológicas ⁶¹, donde se ha reportado que se expresa de manera importante en líneas celulares de leucemia y linfoma. Interesantemente, recientes estudios han reportado que YY1 es capaz de regular la expresión de KLF4 en LNH ⁵⁵, lo que establece una red de expresión entre YY1 y KLF4 al menos en el caso del LNH y pone de manifiesto su importancia y su posible papel en la linfomagénesis y malignidad de la enfermedad. Estos reportes son consistentes con los resultados obtenidos tras el análisis de MAT de DLBCL y LF, en los cuales el análisis de miR-7/YY1/KLF4,

(Figura 8). Adicionalmente nuestros análisis de la expresión del eje miR-7/KLF4/YY1, muestran una correlación negativa de miR-7 vs ambos factores de transcripción en DLBCL y LF **(Figura 9)**. Por lo que las evidencias aquí mostradas apuntan a que el eje miR-7/YY1/KLF4 es un importante biomarcador con posibles empleos de diagnóstico y terapéuticos.

Recientemente, se ha descrito que los miRNAs tienen funciones importantes en la biología de los linfomas, incluyendo linfoma folicular. En células B malignas los miRNAs participan en vías fundamentales para el desarrollo de las células B como el receptor de célula B (BCR), adhesión de migración/de la célula, interacciones de la célula B con nichos del sistema inmunológico, y la producción y el cambio de isótopo de las inmunoglobulinas ⁹⁴. Recientemente se ha propuesto un patrón de expresión de miRNAs que podría estar involucrado en proliferación y viabilidad celular. En este mismo contexto, Wang W *et al* ¹⁴⁹, realizaron un análisis de 851 miRNAs de entre los cuales se observó un patrón de expresión diferencial en tres grupos con una clara diferencia en su expresión (> 2 times, $p < 0.05$). En el segundo grupo se encuentra miR-7, en este grupo se observó que una alta expresión correlaciona directamente con la respuesta al tratamiento de manera específica se observó que la baja expresión de miR-7 fue asociada a una pobre respuesta a la terapia ¹⁴⁹.

Estos resultados son consistentes con nuestros resultados, así como con nuestro análisis realizado en GEO. **(Figura 10C)**, en el cual se observa una menor expresión relativa de miR-7 en pacientes muertos en comparación con pacientes vivos en un estudio de supervivencia total. Adicionalmente se realizó un análisis de supervivencia total por Kaplan Meier, lo cual indicó que pacientes con miR-7 positivo tienen un mayor porcentaje de supervivencia total, en comparación con aquellos pacientes con miR-7 negativo **(Figure 10D)**.

Por lo que los resultados del presente trabajo muestran por primera vez que dos factores de transcripción; YY1 y KLF4, que acorde a la evidencia participan en la malignidad del LNH, son regulados por miR-7 y esto condiciona a las células de LNH, su capacidad de proliferación, migración y quimioresistencia. Lo que permite proponer al eje miR-7/KLF4/YY1 como un posible blanco terapéutico y biomarcador de malignidad.

13. Conclusiones

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran por primera vez que miR-7 regula negativamente a KLF4 y YY1 de manera transcripcional en líneas celulares de LNH. Así mismo demuestran que la disminución de la expresión de miR-7 impacta en la migración y quimioresistencia *in vitro* de líneas celulares de LNH. La correlación negativa fue corroborada en biopsias de pacientes con linfoma difuso de células B grandes y linfoma folicular, lo cual es consistente con los resultados obtenidos *in vitro* y nos permite confirmar la participación de miR-7 en el eje KLF4-YY1, así también sienta las bases para la denominación de miR-7 como supresor tumoral formando así un importante modelo descriptivo de la patogénesis de linfoma difuso de células b grandes y linfoma folicular. **Figura 11.**

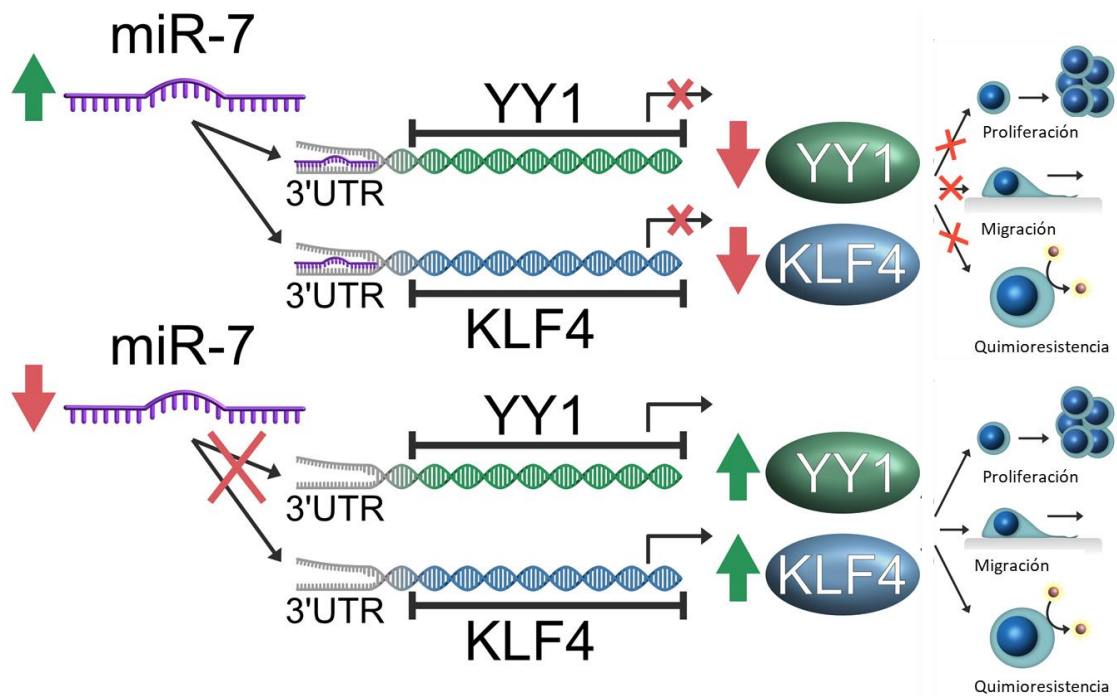


Figura 11. Representación esquemática del modelo propuesto del papel de miR-7 en la regulación del eje YY1/KLF4. Nuestro modelo propone que miR-7 tiene un papel como inhibidor tumoral en NHL, en donde una baja expresión de miR-7 permite la expresión aumentada de KLF4 y YY1 teniendo como consecuencia un incremento en la proliferación, migración y quimioresistencia, mientras que un aumento en la expresión de miR-7 inhibe la expresión de YY1/KLF4 promoviendo una disminución en la proliferación, migración, así como reversión de la quimioresistencia en LNH.

14. Productos obtenidos

Artículos Publicados.

1. **Mario Morales-Martínez**, Gabriel G. Vega, Natividad Neri, Maria J. Nambo, Isabel Alvarado, Ivonne Cuadra, Marco A. Duran-Padilla, Sara Huerta-Yepez and Mario I. Vega MicroRNA-7 (miR-7) regulates migration and chemoresistance in non-Hodgkin lymphoma cells through regulation of KLF4 and YY1. *Front. Oncol.* (2020) doi: 10.3389/fonc.2020.588893
2. **Mario Morales-Martínez**, Mario I. Vega, Alan Lichtenstein. Function of Deptor and its roles in hematological malignancies. *Aging (Albany NY)*. 2021 Jan 7;13(1):1528-1564. doi: 10.18632/aging.202462. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33412518.
3. Mayra Montecillo-Aguado, **Mario Morales-Martínez**, Sara Huerta-Yepez, Mario I. Vega. KLF4 inhibition by Kenpaullone induces cytotoxicity and chemo sensitization in B-NHL cell lines via YY1 independent. *Leuk Lymphoma*. 2021 Jan 7:1-12. doi: 10.1080/10428194.2020.1869960. Epub ahead of print. PMID: 33410342.
4. Mayra Montecillo-Aguado, Belén Tirado-Rodríguez, Zhen Tong, Owen M. Vega, **Mario Morales-Martínez**, Shaheen Abkenari, José Pedraza-Chaverri and Sara Huerta-Yepez. Importance of the Role of Ω -3 and Ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Progression of Brain Cancer *Brain Sci*. 2020, 10, 381; doi:10.3390/brainsci10060381 www.mdpi.com/journal/brainsci
5. Estefany Martínez-Torres, Tania V. López-Pérez, **Mario Morales-Martínez**, and Sara Huerta-Yepez Yin-Yang-1 decreases Fas-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia under hypoxic conditions : its implications in immune evasion. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2020;77(4):186-194 DOI: 10.24875/BMHIM.20000187 www.bmhim.com
6. **Mario Morales-Martínez**, Alberto Valencia-Hipólito, Gabriel G. Vega, Natividad Neri, Maria J. Nambo, Isabel Alvarado, Ivonne Cuadra, Marco A. Duran-Padilla, Otoniel Martínez-Maza, Sara Huerta-Yepez and Mario I. Vega. Regulation of Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) expression through the transcription factor Yin-Yang 1 (YY1) in Non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Oncotarget*, Mar 15;10(22):2173-2188. Año 2019 doi: 10.18632/oncotarget.26745
7. Gerardo Pantoja-Escobar, **Mario Morales-Martínez**, Gabriel G. Vega, Graciela Castro-Escarpulli & Mario I. Vega. Cytotoxic effect caspase activation dependent of a genetically engineered fusion protein with a CD154 peptide mimetic (OmpC-CD154p) on B-NHL cell lines is mediated by the inhibition of bcl-6 and YY1 through MAPK p38 activation. *Leukemia & Lymphoma*, 2019 Apr;60(4):1062-1070. DOI: 10.1080/10428194.2018.1516286

8. **Mario Morales-Martinez**, Luz A. Franco-Cea, Liliana Moreno Vargas, Otoniel Martinez-Maza, Sara Huerta-Yepez, & Mario I. Vega Bifunctional Role of Krüppel-Like Factor 4 in Hematological Malignancies. Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics, 7(1–2): 141–151 (2016)

Congresos

1. 2019 Annual Meeting Abstracts. American Society of Hematology. Volume 134, Issue Supplement_1 November 13, 2019. Memorias. Título: Role of the microRNA-7 (miR-7) in the Inhibition of Chemoresistance and Migration of Lymphoma Non-Hodgkin's through Regulation of YY1 and KLF4
2. Foro Nacional de Investigación en Salud. IMSS "Prevención y control de las enfermedades crónicas: El Papel de la Investigación" octubre 2019. Acapulco Guerrero México. Presentación en cartel. Título: MICRORNA-7 (MIR-7) REGULA LA MIGRACIÓN Y QUIMIORESISTENCIA EN LÍNEAS CELULARES DE LINFOMA NO-HODGKIN A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE KLF4 Y YY1
3. 2017 Annual Meeting Abstracts. American Society of Hematology. Volume 130. Issue Supplement 1. December 7 20187. Memorias. Título: Analysis of Mir-7 (microRNA-7) Expression in Non-Hodgkin Lymphomas and Its Possible Role in the Regulation of the Transcription Factor KLF4 and YY1
4. 2016 Annual Meeting Abstracts. American Society of Hematology. Volume 128, Issue 22. December 2 2016. Memorias. Título: Fusion Protein Ompc-CD154 Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in B-NHL Cell Lines By a Mechanism That Involves MAPK P38 and TRAF2 Activation. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.5306.5306>
5. Foro Nacional de Investigación IMSS 2015. Presentación en cartel del trabajo: INDUCCION DE APOPTOSIS DEPENDIENTE CASPASAS EN LINEAS CELULARES DE LINFOMA NO HODGKIN POR TRATAMIENTO CON PROTEINA QUIMÉRICA ompc CD154.

Capítulos de Libro

1. **Mario Morales-Martínez** and Mario I Vega. Capítulo 10: Participation of Different miRNAs in the Regulation of YY1; Their Role in Pathogenesis. Libro: YY1 in the Control of the Pathogenesis and Drug Resistance of Cancer: a critical Therapeutic Target. Editor: Benjamin Bonavida. Editorial: Elseiver, 2020. ISBN B978-0-12-821909-6.00010-9, 00010.

2. Tania V. Lopez-Perez, Belén Tirado-Rodríguez **Mario Morales Martínez**, Mayra Montecillo-Aguado Sara Huerta-Yepes. Capítulo 15: YY1 regulation of tumor cell resistance to both chemo and immunotherapeutic drugs. Libro: YY1 in the Control of the Pathogenesis and Drug Resistance of Cancer: a critical Therapeutic Target. Editor: Benjamin Bonavida. Editorial: Elsevier, 2020. ISBN B978-0-12-821909-6.00010-9, 00010.

15. Agradecimientos y financiamiento

Este trabajo fue realizando gracias a la beca otorgada por CONACyT, México. Mario Morales Martínez fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (M. M.-M. 739423/596754)

Este trabajo recibió apoyo por parte del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social FIS/IMSS/PROT/G10/837, FIS/IMSS/PROT/PRI0/14/035 y FIS/IMSS/PROT/MD13/1246

16. Referencias

1. Hecht, J. L. & Aster, J. C. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3707–21 (2000).
2. Jemal, A. *et al.* Global Cancer Statistics: 2011. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
3. Boffetta, P. I. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. *Ann. Oncol.* **22**, iv27–iv31 (2011).
4. Morton, L. M. *et al.* Etiologic Heterogeneity Among Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monogr.* **2014**, 130–144 (2014).
5. Cerhan, J. R. & Slager, S. L. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood* **126**, 2265–2273 (2015).
6. American-Cancer-Society. Cancer Facts and Figures 2017. (2017).
7. Boring, C. C., Squires, T. S., Tong, T. & Montgomery, S. Cancer statistics, 1994. *CA. Cancer J. Clin.* **44**, 7–26.
8. The Global Cancer Observatory. CANCER TODAY. 2 <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf> (2020).
9. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 7–30 (2018).
10. Miao, Y., Medeiros, L. J., Li, Y., Li, J. & Young, K. H. Genetic alterations and their clinical implications in DLBCL. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 16 634–652 (2019).
11. National Cancer Institute. Lymphoma—Health Professional Version - National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp>.
12. Singh, R. *et al.* Non-Hodgkin's lymphoma: A review. *J. Fam. Med. Prim. Care* **9**, 1834 (2020).
13. Gupta, S., Gupta, R., Singh, S., Gupta, K. & Kudesia, M. Nuclear morphometry and texture analysis of B-cell non-Hodgkin lymphoma: Utility in subclassification on cytospreads. *Diagn. Cytopathol.* **38**, NA-NA (2009).
14. Jaffe, E. S., Barr, P. M. & Smith, S. M. Understanding the New WHO Classification of Lymphoid Malignancies: Why It's Important and How It Will Affect Practice. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **37**, 535–546 (2017).
15. Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A. & Cavalli, F. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet (London, England)* **390**, 298–310 (2017).
16. Ohno, H., Ueda, C. & Akasaka, T. The t(9;14)(p13;q32) translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **36**, 435–445 (2000).
17. Kridel, R., Sehn, L. H. & Gascoyne, R. D. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J. Clin. Invest.* **122**, 3424–31 (2012).
18. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol* **15**, 172–184 (2015).
19. Grimm, K. E. & O'Malley, D. P. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Ann. Diagn. Pathol.* **38**, 6–10 (2019).
20. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* vol. 127 2375–2390 (2016).
21. Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* vol. 8 22–33 (2008).

22. Di Noia, J. M. & Neuberger, M. S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry* vol. 76 1–22 (2007).
23. Pasqualucci, L. & Dalla-Favera, R. SnapShot: Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* **25**, 132–132.e1 (2014).
24. Castillo, J. J. *et al.* Obesity Is Associated With Increased Relative Risk of Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **14**, 122–130 (2014).
25. Shiels, M. S. *et al.* The Epidemic of Non-Hodgkin Lymphoma in the United States: Disentangling the Effect of HIV, 1992–2009. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **22**, 1069–1078 (2013).
26. Bayerdörffer, E. *et al.* Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet (London, England)* **345**, 1591–4 (1995).
27. Saha, A. & Robertson, E. S. Epstein-Barr Virus-Associated B-cell Lymphomas: Pathogenesis and Clinical Outcomes. *Clin. Cancer Res.* **17**, 3056–3063 (2011).
28. Giordano, T. P. *et al.* Risk of Non-Hodgkin Lymphoma and Lymphoproliferative Precursor Diseases in US Veterans With Hepatitis C Virus. *JAMA* **297**, 2010 (2007).
29. Armitage, J. O. & Weisenburger, D. D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2780–2795 (1998).
30. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **329**, 987–994 (1993).
31. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* **89**, 3909–18 (1997).
32. Brittinger, G. *et al.* Clinical and prognostic relevance of the Kiel classification of non-Hodgkin lymphomas results of a prospective multicenter study by the Kiel Lymphoma Study Group. *Hematol. Oncol.* **2**, 269–306.
33. Harris, N. L. *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361–92 (1994).
34. Candelaria, M. *et al.* A Prognostic Score for Survival in Patients Older than 65 Years with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Rev. Investig. Clínica* **70**, (2018).
35. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).
36. Chang, C.-C. *et al.* Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 464–70 (2004).
37. Carbone, A. *et al.* Follicular lymphoma. *Nature Reviews Disease Primers* vol. 5 (2019).
38. Cleary, M. L. & Sklar, J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7439–7443 (1985).
39. Swenson, W. T. *et al.* Improved Survival of Follicular Lymphoma Patients in the United States. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5019–5026 (2005).
40. Liu, Q. *et al.* Improvement of overall and failure-free survival in stage IV follicular lymphoma: 25 years of treatment experience at The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1582–9 (2006).

41. Casulo, C. *et al.* Early relapse of follicular lymphoma after rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone defines patients at high risk for death: An analysis from the National LymphoCare Study. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2516–2522 (2015).
42. Bitansky, G. *et al.* Progression of Follicular Lymphoma within 24 Months of First Treatment (POD -24) As a Predictor of Overall Survival - a Single Center Retrospective Analysis. *Blood* **134**, 1534–1534 (2019).
43. Armitage, J. O. & Longo, D. L. Is watch and wait still acceptable for patients with low-grade follicular lymphoma? *Blood* **127**, 2804–8 (2016).
44. Casulo, C. & Friedberg, J. Treating Burkitt Lymphoma in Adults. *Current Hematologic Malignancy Reports* vol. 10 266–271 (2015).
45. Magrath, I. *et al.* Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J. Clin. Oncol.* **14**, 925–934 (1996).
46. Thomas, D. A. *et al.* Hyper-CVAD Program in Burkitt's-Type Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2461–2461 (1999).
47. Jacobson, C. & LaCasce, A. How I treat Burkitt lymphoma in adults. *Blood* **124**, 2913–2920 (2014).
48. Campo, E. Whole genome profiling and other high throughput technologies in lymphoid neoplasms—current contributions and future hopes. *Mod. Pathol.* **26**, 97–110 (2013).
49. Chapuy, B. *et al.* Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* **24**, 679–690 (2018).
50. Sun, R., Medeiros, L. J. & Young, K. H. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. *Mod. Pathol.* **29**, 1118–1142 (2016).
51. Valencia-Hipólito, A. *et al.* Expression of KLF4 is a predictive marker for survival in pediatric Burkitt lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **55**, 1806–1814 (2014).
52. Antonio-Andrés, G. *et al.* Role of Yin Yang-1 (YY1) in the transcription regulation of the multi-drug resistance (MDR1) gene. *Leuk. Lymphoma* **59**, 2628–2638 (2018).
53. Vega, M. I. *et al.* Rituximab-mediated cell signaling and chemo/immuno-sensitization of drug-resistant B-NHL is independent of its Fc functions. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6582–6594 (2009).
54. Martínez-Torres, E., López-Pérez, T. V., Morales-Martínez, M. & Huerta-Yepez, S. Yin-yang-1 decreases fas-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia under hypoxic conditions: Its implications in immune evasion. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **77**, 186–194 (2020).
55. Morales-Martinez, M. *et al.* Regulation of Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) expression through the transcription factor Yin-Yang 1 (YY1) in non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Oncotarget* **10**, 2173–2188 (2019).
56. Morales-Martinez, M. *et al.* Regulation of Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) expression through the transcription factor Yin-Yang 1 (YY1) in non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Oncotarget* **10**, 2173–2188 (2019).
57. Klug, A. & Schwabe, J. W. Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* **9**, 597–604 (1995).
58. Garrett-Sinha, L. A., Eberspaecher, H., Seldin, M. F. & de Crombrugge, B. A Gene for a Novel Zinc-finger Protein Expressed in Differentiated Epithelial Cells and Transiently in Certain Mesenchymal Cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 31384–31390 (1996).
59. Shields, J. M., Christy, R. J. & Yang, V. W. Identification and Characterization of a Gene Encoding a Gut-enriched Krüppel-like Factor Expressed during Growth Arrest. *J. Biol.*

- Chem.* **271**, 20009–20017 (1996).
60. Fruman, D. A. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase and Bruton's tyrosine kinase regulate overlapping sets of genes in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 359–364 (2002).
 61. Yoon, H. S. *et al.* Krüppel-like factor 4 prevents centrosome amplification following γ -irradiation-induced DNA damage. *Oncogene* **24**, 4017–4025 (2005).
 62. Yusuf, I. *et al.* KLF4 is a FOXO target gene that suppresses B cell proliferation. *Int. Immunol.* **20**, 671–681 (2008).
 63. Yu, F. *et al.* Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene* **30**, 2161–72 (2011).
 64. Wieschaus, E., Nusslein-Volhard, C. & Kluding, H. Krüppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. *Dev. Biol.* **104**, 172–186 (1984).
 65. Guan, H. *et al.* KLF4 is a tumor suppressor in B-cell non-Hodgkin lymphoma and in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **116**, 1469–1478 (2010).
 66. Dang, D. T., Zhao, W., Mahatan, C. S., Geiman, D. E. & Yang, V. W. Opposing effects of Krüppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor) and Krüppel-like factor 5 (intestinal-enriched Krüppel-like factor) on the promoter of the Krüppel-like factor 4 gene. *Nucleic Acids Research* vol. 30 2736–2741 (2002).
 67. Evans, P. M. & Liu, C. Roles of Krüppel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **40**, 554–64 (2008).
 68. Foster, K. W. *et al.* Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation–differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia. *Oncogene* **24**, 1491–1500 (2005).
 69. Huang, C. C. *et al.* KLF4 and PCNA identify stages of tumor initiation in a conditional model of cutaneous squamous epithelial neoplasia. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 1401–1408 (2005).
 70. Kharas, M. G. *et al.* KLF4 suppresses transformation of pre-B cells by ABL oncogenes. *Blood* **109**, 747–755 (2007).
 71. Foster, K. W. *et al.* Increase of GSK3 messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.* **60**, 6488–95 (2000).
 72. Pandya, A. Y. *et al.* Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2709–19 (2004).
 73. Rowland, B. D., Bernards, R. & Peeper, D. S. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1074–1082 (2005).
 74. Rowland, B. D., Bernards, R. & Peeper, D. S. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1074–82 (2005).
 75. Yu, F. *et al.* Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene* **30**, 2161–2172 (2011).
 76. Evans, P. M. & Liu, C. Roles of Krüppel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **40**, 554–564 (2008).
 77. Yasunaga, J. I. *et al.* Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia. *Cancer Res.* **64**, 6002–6009 (2004).
 78. Huang, Y. *et al.* HDAC1 and Klf4 interplay critically regulates human myeloid leukemia cell proliferation. *Cell Death Dis.* **5**, (2014).

79. Li, W. *et al.* Genome-wide analyses identify KLF4 as an important negative regulator in T-cell acute lymphoblastic leukemia through directly inhibiting T-cell associated genes. *Mol. Cancer* **14**, (2015).
80. Valencia-Hipólito, A. *et al.* Expression of KLF4 is a predictive marker for survival in pediatric Burkitt lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **55**, 1806–14 (2014).
81. Riz, I., Hawley, T. S. & Hawley, R. G. KLF4-SQSTM1/p62-associated prosurvival autophagy contributes to carfilzomib resistance in multiple myeloma models. *Oncotarget* **6**, 14814–14831 (2015).
82. Malik, D., Kaul, D., Chauhan, N. & Marwaha, R. K. MiR-2909-mediated regulation of KLF4: A novel molecular mechanism for differentiating between B-cell and T-cell pediatric acute lymphoblastic leukemias. *Mol. Cancer* **13**, 175 (2014).
83. Okuda, H. *et al.* MiR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4. *Cancer Res.* **73**, 1434–1444 (2013).
84. Zhang, N. *et al.* microRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis. *Oncogene* **32**, 5078–88 (2013).
85. Castellano, G. *et al.* Yin Yang 1 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with B-cell transformation and tumor progression. *Cell Cycle* **9**, 557–63 (2010).
86. Sakhinia, E. *et al.* Clinical quantitation of diagnostic and predictive gene expression levels in follicular and diffuse large B-cell lymphoma by RT-PCR gene expression profiling. *Blood* **109**, 3922–8 (2007).
87. Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H. & Bonavida, B. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**, 1125–1142 (2006).
88. Guo, J., Lin, X., Williams, M. A., Hamid, Q. & Georas, S. N. Yin-Yang 1 regulates effector cytokine gene expression and TH2 immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 195-201.e5 (2008).
89. Castellano, G. *et al.* Yin Yang 1 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with B-cell transformation and tumor progression. *Cell Cycle* **9**, 557–63 (2010).
90. Seligson, D. *et al.* Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *Int. J. Oncol.* **27**, 131–41 (2005).
91. Liu, H. *et al.* Targeting the Over-Expressed Transcription Factor Yin-Yang 1 (YY1) Sensitizes Resistant Multiple Myeloma (MM) Cell Lines to Apoptosis by Bortezomib or Melphalan,. *Blood* **118**, (2011).
92. Naidoo, K. *et al.* YY1 expression predicts favourable outcome in follicular lymphoma. *J. Clin. Pathol.* **64**, 125–129 (2011).
93. Ambros, V. microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell* vol. 107 823–826 (2001).
94. Musilova, K. & Mraz, M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia* **29**, 1004–1017 (2015).
95. Wang, D., Gu, J., Wang, T. & Ding, Z. OncomiRDB: A database for the experimentally verified oncogenic and tumor-suppressive microRNAs. *Bioinformatics* **30**, 2237–2238 (2014).
96. Ozsolak, F. *et al.* Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* **22**, 3172–83 (2008).
97. Monteys, A. M. *et al.* Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* **16**, 495–505 (2010).

98. Galasso, M., Sandhu, S. K. & Volinia, S. MicroRNA expression signatures in solid malignancies. *Cancer J* **18**, 238–243 (2012).
99. He, L. *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828–833 (2005).
100. Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B. & Lyko, F. Methylation of human MicroRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* vol. 6 1001–1005 (2007).
101. Agirre, X., Martínez-Climent, J. Á., Otero, M. D. & Prósper, F. Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia* vol. 26 395–403 (2012).
102. Chim, C. S. *et al.* Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. *Carcinogenesis* **31**, 745–750 (2010).
103. Stumpel, D. J. P. M. *et al.* Hypermethylation of specific microRNA genes in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: Major matters at a micro scale. *Leukemia* **25**, 429–439 (2011).
104. Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2999–3004 (2004).
105. Wang, V. & Wu, W. MicroRNA-Based Therapeutics for Cancer. *BioDrugs* **23**, 15–23 (2009).
106. Van Roosbroeck, K. & Calin, G. A. Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection. in *Advances in Cancer Research* vol. 135 119–149 (Academic Press Inc., 2017).
107. Huang, J. *et al.* Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J. Biol. Chem.* **282**, 33632–33640 (2007).
108. Png, K. J. *et al.* MicroRNA-335 inhibits tumor reinitiation and is silenced through genetic and epigenetic mechanisms in human breast cancer. *Genes Dev.* **25**, 226–231 (2011).
109. Tavazoie, S. F. *et al.* Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* **451**, 147–152 (2008).
110. Ji, Y., Sun, Q., Zhang, J. & Hu, H. MiR-615 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting EGFR in human glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**, 719–726 (2018).
111. Wang, H. *et al.* MicroRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1. *BMC Cancer* **19**, 738 (2019).
112. B, Y. & KC, Z. MicroRNA-144-3p inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in castration-resistant prostate cancer by targeting CEP55. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, (2018).
113. Zhu, Z. J. *et al.* MicroRNA-181a promotes proliferation and inhibits apoptosis by suppressing CFIm25 in osteosarcoma. *Mol. Med. Rep.* **14**, 4271–4278 (2016).
114. Zhuang, G. *et al.* Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J.* **31**, 3513–3523 (2012).
115. Sun, C. Y. *et al.* miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis* **34**, 426–435 (2013).
116. Zhang, X. *et al.* Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. *Cancer Res.* **70**, 7176–7186 (2010).
117. Lal, A. *et al.* MiR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 492–498 (2009).
118. Lal, A. *et al.* p16INK4a translation suppressed by miR-24. *PLoS One* **3**, (2008).

119. Benetti, R. *et al.* A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 268–279 (2008).
120. Rodriguez, A. *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science (80-.)*. **316**, 608–611 (2007).
121. Ventura, A. *et al.* Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell* **132**, 875–886 (2008).
122. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
123. Basso, K. *et al.* Identification of the Human Mature B Cell miRNome. *Immunity* **30**, 744–752 (2009).
124. Lan, H., Lu, H., Wang, X. & Jin, H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: Opportunities and challenges. *BioMed Research International* vol. 2015 (2015).
125. Getaneh, Z., Asrie, F. & Melku, M. MicroRNA profiles in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *EJIFCC* **30**, 195–214 (2019).
126. Hummel, R., Hussey, D. J. & Haier, J. MicroRNAs: Predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *Eur. J. Cancer* **46**, 298–311 (2010).
127. Takeshita, F. *et al.* Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol. Ther.* **18**, 181–187 (2010).
128. Wang, V. & Wu, W. MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs* vol. 23 15–23 (2009).
129. Iorio, M. V. *et al.* MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **65**, 7065–7070 (2005).
130. Glover, A. R. *et al.* microRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. *Oncotarget* **6**, 36675–88 (2015).
131. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13944–13949 (2005).
132. Lawrie, C. H. *et al.* MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int. J. Cancer* **121**, 1156–1161 (2007).
133. Schramedei, K. *et al.* MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene* **30**, 2975–2985 (2011).
134. Kluiver, J. *et al.* BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* **207**, 243–249 (2005).
135. Lawrie, C. H. MicroRNAs and lymphomagenesis: A functional review. *British Journal of Haematology* vol. 160 571–581 (2013).
136. Lagos-Quintana, M. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science (80-.)*. **294**, 853–858 (2001).
137. Kalinowski, F. C. *et al.* MicroRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **54**, 312–317 (2014).
138. Correa-Medina, M. *et al.* MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. *Gene Expr. Patterns* **9**, 193–199 (2009).
139. Reddy, S. D. N., Ohshiro, K., Rayala, S. K. & Kumar, R. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res.* **68**, 8195–8200 (2008).

140. McInnes, N. *et al.* FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells. *Oncogene* **31**, 1045–1054 (2012).
141. Chou, Y. T. *et al.* EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res.* **70**, 8822–8831 (2010).
142. Wu, H. *et al.* A Splicing-Independent Function of SF2/ASF in MicroRNA Processing. *Mol. Cell* **38**, 67–77 (2010).
143. Li, Y.-J. *et al.* TLR9 signaling repressed tumor suppressor miR-7 expression through up-regulation of HuR in human lung cancer cells. *Cancer Cell Int.* **13**, 90 (2013).
144. Xu, L. *et al.* MicroRNA-7-regulated TLR9 signaling-enhanced growth and metastatic potential of human lung cancer cells by altering the phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3/Akt pathway. *Mol. Biol. Cell* **24**, 42–55 (2013).
145. Cheng, J. *et al.* An Extensive Network of TET2-Targeting MicroRNAs Regulates Malignant Hematopoiesis. *Cell Rep.* **5**, 471–481 (2013).
146. Xu, L., Liang, Y., Luo, X., Liu, X. & Guo, H. [Association of miRNAs expression profiles with prognosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **32**, 178–181 (2011).
147. Chen, X., Xiong, W. & Li, H. Comparison of microRNA expression profiles in K562-cells-derived microvesicles and parental cells, and analysis of their roles in leukemia. *Oncol. Lett.* **12**, 4937–4948 (2016).
148. Blume, C. J. *et al.* P53-dependent non-coding RNA networks in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **29**, 2015–2023 (2015).
149. Wang, W. *et al.* MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response. *Haematologica* **97**, 586–594 (2012).
150. Morales-Martinez, M. *et al.* Bifunctional Role of Kruppel-Like Factor 4 in Hematological Malignancies. *For. Immunopathol. Dis. Therap.* **7**, 141–151 (2016).
151. Zhao, J. *et al.* MicroRNA-7 Deficiency Ameliorates the Pathologies of Acute Lung Injury through Elevating KLF4. *Front. Immunol.* **7**, 389 (2016).
152. Zhang, N. *et al.* MicroRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis. *Oncogene* **32**, 5078–5088 (2013).
153. Huang, H.-Y. *et al.* miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Res.* **48**, (2020).
154. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. & Anderson, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **302**, 1–12 (2007).
155. Deng, Z., Cao, P., Wan, M. M. & Sui, G. Yin Yang 1. *Transcription* **1**, 81–84 (2010).
156. Palko, L., Bass, H. W., Beyrouthy, M. J. & Hurt, M. M. The Yin Yang-1 (YY1) protein undergoes a DNA-replication-associated switch in localization from the cytoplasm to the nucleus at the onset of S phase. *J. Cell Sci.* **117**, 465–476 (2003).
157. Liu, H. *et al.* Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes Dev.* **21**, 1179–1189 (2007).
158. Green, M. R. *et al.* Signatures of murine B-cell development implicate Yy1 as a regulator of the germinal center-specific program. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2873–2878 (2011).
159. Zhang, Q., Stovall, D. B., Inoue, K. & Sui, G. The oncogenic role of Yin Yang 1. *Crit. Rev. Oncog.* **16**, 163–97 (2011).
160. Mayra R Montecillo-Aguado, Gabriel G Vega, Hector Mayani, Sara Huerta-Yepe, Benjamin Bonavida, O. M.-M. and M. I. V. Paper: KLF4 and YY1 Are Resistant Factors

in NHL and Potential Therapeutic Targets: The New Resistant NF- κ b/YY1/KLF4/Bcl_{xL}/Mcl-1 Axis. in *ASH* (2015).

161. Vega, M. I., Jazirehi, A. R., Huerta-Yepe, S. & Bonavida, B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J. Immunol.* **175**, 2174–83 (2005).
162. Shie, J. L., Chen, Z. Y., Fu, M., Pestell, R. G. & Tseng, C. C. Gut-enriched Krüppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2969–76 (2000).