



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

**EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES
ABCB1, ABCC1 Y ABCG2 EN
RETINOBLASTOMAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

OFELIA NEREIDA LOYOLA MEJIA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARTHA VERÓNICA PONCE CASTAÑEDA



CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Loyola
Mejía
Ofelia Nereida
63 95 71 74
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311243240

2. Datos del tutor

Dra.
Martha Verónica
Ponce
Castañeda

3. Datos de sinodal 1

Dra.
María del Pilar
Eguía
Aguilar

4. Datos de sinodal 2

Dra.
Vilma Araceli
Maldonado
Lagunas

5. Datos de sinodal 3

Dra.
Patricia
Piña
Sánchez

6. Datos de sinodal 4

M.C
María de Lourdes
Cabrera
Muñoz

7. Datos del trabajo escrito

Expresión de los transportadores ABCB1,
ABCC1 y ABCG2 en retinoblastomas
60p
2019

Este proyecto fue financiado por el IMSS con el número **FIS/IMSS/PROT/G15/1471**. La investigación contenida en esta tesis fue realizada en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund del Centro Médico Nacional SXXI.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y haberme permitido desarrollarme tanto académicamente como profesionalmente, por darme herramientas para enfrentar la vida y por todas las experiencias vividas que han marcado mi vida.

A todos los integrantes que formaron parte en este proyecto: Mi tutora de tesis la Dra. Verónica Ponce, Dra. Lourdes Cabrera, Dr. Alejandro Gómez, M. C Adriana Hernández, T. S Josefina Romero, H.T Adrián Palma, H.T Daniel Enríquez, H.T Miguel Sandoval, H.T Dafne, Biol. Patricia Ruiz y al Médico Miguel Sánchez.

A mi asesora de tesis, la Dra. Verónica Ponce, por haberme apoyado en este proceso, por ser mi guía para realizar este trabajo, por darme la oportunidad de desarrollar mis habilidades y por depositar su confianza en mí. Gracias por aquellos momentos en los cuales me explicaba extensamente y pacientemente mis dudas. También quiero agradecerle enormemente los regaños porque fueron necesarios para no flaquear en este proceso. Admiro su inteligencia, su seguridad y su carácter aguerrido.

A mis sinodales, por dedicar de su tiempo en revisar mi trabajo y aportar sus valiosos comentarios que enriquecieron mi trabajo.

A la Dra. Cabrera, por brindarme su tiempo y paciencia en cada sesión que teníamos, por los cursos a los cuales me invito y que sirvieron para forzar mis conocimientos. Con cada plática que tuve con usted, me llevé una enseñanza de vida. ¡La admiro!, es un ejemplo a seguir.

A la M. C Adriana Hernández, por su apoyo incondicional en todos los aspectos, por sus comentarios constructivos, por brindarme su gran baraje de conocimientos tanto teóricos como prácticos. Hizo que mi estancia en el laboratorio fuera amena. Le agradezco por sus pláticas interesantes, por todas esas risas que causo en mí. Extrañaré su presencia y su personalidad tan única.

Al Dr. Miguel Velázquez y la Dra. Ruth Esparza, por sus valiosas críticas en los seminarios del taller, por sus motivaciones y su amistad.

H.T Miguel Sandoval por ser tan servicial y responsable en cada sesión, por todas esas motivaciones, por apoyarme, por aconsejarme, por hacerme reír y aguantar mis cambios de actitud. Mi estancia en el Instituto fue inigualable y grata gracias a ti. ¡¡Te quiero Miki!!

H.T Adrián Palma, por todas esas horas que pasamos juntos trabajando y en ocasiones comiendo, por enseñarme la técnica de IHQ, por todos esos momentos divertidos que me hiciste pasar. Eres un gran profesor y un gran amigo

A la Dra. Nora, Edgar, Hugo y Ari por hacer que mi estancia en el laboratorio fuese divertida, gracias por sus bromas, por su apoyo, por regalarme muchos momentos gratos.

Agradecimientos Personales

A mis padres por darme la vida, por haberme apoyado y enseñado a ser una mejor persona, por creer en mí, por aconsejarme y tenerme paciencia. Gracias por todos los valores, por formarme como una persona responsable, constante e independiente y por todas las herramientas que me brindaron para que yo pudiera llegar hasta este punto en mi vida. ¡Lo amo!

A mis hermanos, por apoyarme en todo momento, por su cariño, por sus comentarios constructivos, por poner atención cuando les explicaba algo o ensayaba alguna presentación y por todos esos momentos de felicidad que hemos vivido.

Mi gran amor David Pinchao, porque llegaste en el momento preciso, en todo momento me motivaste para no desertar, por tu apoyo incondicional para que continuaré mis estudios, por resolver mis dudas, por escucharme, por todos esos momentos fabulosos que hemos vivido durante casi 5 años. Gracias por estar en mis logros y en mis fracasos.

A mis amigos de la Facultad: Cecilia Cervantes, Ana Aguilar y Ángel Antares; porque gracias a su sentido del humor mis clases por las noches fueron amenas, por aquellas prácticas de campo en las que compartimos momentos inolvidables, por su apoyo incondicional y porque han estado en mis los mejores momentos, pero también en mis adversidades.

A mis compañeras del taller: Andrea Cervantes y Viviana Castro; por su disposición a ayudarme, por las motivaciones, por tantas risas y sobre todo por su compañerismo. A mis compañeros de doctorado Diana Álvarez y Roberto Torres, por su apoyo en mis peores momentos, por ayudarme a resolver mis interminables dudas.

A mis amigos de la Preparatoria: mi biólogo favorito y mi mejor amigo Andrés Cano, Uriel Villalobos y Viridiana Rodríguez; por brindarme su amistad durante estos 8 años, por tantas risas, tantas aventuras, por sus consejos, por estar presentes cuando más los necesito y también por los regaños. ¡Los quiero!

A Josesito, por esas palabras reconfortantes en mis momentos de crisis, por confiar en mí, por escucharme y aconsejarme, por tu apoyo incondicional y te agradezco todos esos momentos divertidos que me has regalado. A mi amigo Raúl, por regalarme tu confianza y amistad, porque siempre has tenido la disposición de enseñarme y ayudarme a vencer mis miedos.

"Si no hay dudas, no hay progreso"
Charles Darwin

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE GRÁFICOS.....	X

EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCB1, ABCC1 Y ABCG2 EN RETINOBLASTOMAS I

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES 2

1.1 RETINOBLASTOMA.....	2
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	3
1.3 ETIOLOGÍA.....	4
1.4 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN RB1 / PRB.....	4
1.5 BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA PROTEÍNA PRB.....	5

2. HISTOLOGÍA DEL RETINOBLASTOMA 6

2.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	8
2.2 ESTRATIFICACIÓN.....	9
2.3 TRATAMIENTO.....	10

3. MECANISMOS MOLECULARES DE QUIMIO RESISTENCIA EN CÁNCER 11

3.1 AUTOFAGIA.....	13
3.2 CÉLULAS TRONCALES DEL CÁNCER.....	13
3.3 TRANSPORTADORES ABC.....	13

4. TRANSPORTADORES ABC 13

4.1 RESISTENCIA A FÁRMACOS.....	17
4.2 TRANSPORTADORES ABC IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS.....	18
4.3 ABCB1.....	18
4.4 ABCC1.....	20
4.5 ABCG2.....	22
4.6 TRANSPORTADORES ABC Y RETINOBLASTOMA.....	23

5. JUSTIFICACIÓN..... 23

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 24

7. OBJETIVO GENERAL:	24
7.1 DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCB1, ABCC1 Y ABCG2 EN RETINOBLASTOMAS PRIMARIOS UNILATERALES Y BILATERALES POR LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.	24
8. OBJETIVOS PARTICULARES:	24
8.1 REALIZAR MICROARREGLOS DE TEJIDOS COMO HERRAMIENTA DE MEDIANA DENSIDAD PARA EVALUAR SI LAS PROTEÍNAS ABCB1, C1 Y G2 SE EXPRESAN O NO EN RETINOBLASTOMAS PRIMARIOS.	24
8.2 LLEVAR A CABO TINCIONES DE INMUNOHISTOQUÍMICA SOBRE LOS MICROARREGLOS USANDO ANTICUERPOS CONTRA LOS TRANSPORTADORES ABCB1, ABCC1 Y ABCG2.	24
8.3 DETERMINAR SI EXISTE CORRELACIÓN DE LOS HALLAZGOS MOLECULARES CON DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CORRESPONDIENTES A LATERALIDAD Y GÉNERO.	24
9. HIPÓTESIS	24
10. MÉTODO	25
10.1 TEJIDOS TUMORALES	25
10.2 MICROARREGLOS	25
10.3 INMUNOHISTOQUÍMICA	27
11. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	28
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
13. RESULTADOS	29
13.1 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ABCB1, ABCC1 Y ABCG2 EN TEJIDOS CONTROLES	31
13.2 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ABC	33
13.3 RESUMEN DE HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	37
13.4 ASOCIACIÓN DE DATOS CLÍNICOS	39
14. DISCUSIÓN	40
15. CONCLUSIONES	42
16. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	43
17. REFERENCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ESQUEMATIZACIÓN DEL CROMOSOMA 13.....	5
FIGURA 2 GENES INVOLUCRADOS EN LA TRANSICIÓN G1/S DEL CICLO CELULAR)	6
FIGURA 3 EN LA IMAGEN SE PUEDE APRECIAR LA FORMACIÓN CARACTERÍSTICA DE CÉLULAS TUMORALES EN ROSETAS Y FLEURETTES.	8
FIGURA 4 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA QUIMIO RESISTENCIA DEL CÁNCER	12
FIGURA 5 ESTRUCTURA DE LOS TRANSPORTADORES ABC ORIENTADA HACIA EL INTERIOR	16
FIGURA 6 MECANISMO DE TRANSLOCACIÓN A TRAVÉS DE LA MEMBRANA LIPÍDICA	17
FIGURA 7 ESQUEMATIZACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DEL GEN ABCB1 EN EL CROMOSOMA 7.....	19
FIGURA 8 ESQUEMATIZACIÓN DEL GEN ABCC1 EN EL CROMOSOMA 16	21
FIGURA 9 ESQUEMATIZACIÓN DEL GEN ABCG2 EN EL CROMOSOMA 4	23
FIGURA 10 DISEÑO DEL MAPA DE LOS MICROARREGLOS.....	26
FIGURA 11 HÍGADO CONTROL PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR ABCB1	32
FIGURA 12 APÉNDICE CECAL CONTROL POSITIVO PARA EL TRANSPORTADOR ABCC1.	32
FIGURA 13 APÉNDICE CECAL CONTROL PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR ABCG2.	33
FIGURA 14 EN LA RETINA NO TUMORAL SE OBSERVÓ TINCIÓN POSITIVA PARA EL TRANSPORTADOR ABCCG2.	34
FIGURA 15 INMUNOTINCIÓN EN RETINOBLASTOMA DE LAS CÉLULAS TUMORALES SON POSITIVAS PARA ABCB1	35
FIGURA 16 INMUNOTINCIÓNEN RETINOBLASTOMA DE CÉLULAS TUMORALES CONTRA EL ANTICUERPO ABCC1.....	36
FIGURA 17 INMUNOTINCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CONTRA EL ANTICUERPO ABCG2....	37

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 CLASIFICACIÓN REESE- ELLSWOTRH	9
TABLA 2 FUNCIONES QUE DESEMPEÑAN LOS TRANSPORTADORES ABC Y LAS CONSECUENCIAS QUE CAUSAN SI SUFREN DAÑO EN SU FUNCIONAMIENTO.....	14
TABLA 3 SUBFAMILIA DE LOS GENES ABCB, SU UBICACIÓN Y PRINCIPALES FUNCIONES.	18
TABLA 4 SUBFAMILIA DE LOS GENES ABCC, SU UBICACIÓN Y SUS PRINCIPALES FUNCIONES	20
TABLA 5 SUBFAMILIA DE LOS GENES ABCG2, SU UBICACIÓN Y SUS PRINCIPALES FUNCIONES.....	22
TABLA 6 RESUMEN DE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	38
TABLA 7 EXPRESIÓN GLOBAL POSITIVA Y NEGATIVA DE LOS TRANSPORTADORES ABC.....	38
TABLA 8 EXPRESIÓN DE UNO O MÁS TRANSPORTADORES EN RETINOBLASTOMAS.....	39
TABLA 9 EXPRESIÓN DOBLE O MÚLTIPLE DE LOS TRANSPORTADORES EN RETINOBLASTOMAS.....	39
TABLA 10 ASOCIACIÓN DE LOS DATOS CLÍNICOS CON LA EXPRESIÓN DE CADA TRANSPORTADOR ABC.....	39
TABLA 11 EN LA TABLA SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS	40

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1 EN LA GRÁFICA SE MUESTRA EL TOTAL DE VARONES Y MUJERES QUE SE INCLUYERON EN ESTE ESTUDIO .	29
GRÁFICA 2 EN LA GRÁFICA SE MUESTRA EL TOTAL DE CASOS UNILATERALES Y BILATERALES QUE SE INCLUYERON EN ESTE ESTUDIO	30
GRÁFICA 3 TOTAL DE VARONES Y MUJERES CON SU CORRESPONDIENTE LATERALIDAD	30

ABREVIATURAS

RB	Retinoblastoma
ABC	Transportadores dependientes de ATP
ATP	Adenosin trifosfato
MDR	Resistencia a múltiples fármacos
IHQ	Inmunohistoquímica
CSC	Células madre del cáncer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CDK	Quinasas dependientes de ciclinas
MDR1/P-gp	Transportador ABCB1
MRP	Transportador ABCC1
BCRP	Transportador ABCG2
SNC	Sistema Nervioso Central
MAT	Microarreglo de tejido
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
NBDs	Dominios de unión a nucleótidos
TMD	Dominios transmembrana
pRB	Proteína nuclear de retinoblastoma
kDa	Kilodalton
E2F	Factor de transcripción

Resumen

El retinoblastoma es un tumor maligno intraocular que se origina en la retina, se presenta durante la infancia temprana y puede afectar de forma unilateral o bilateral. Existen dos tipos de retinoblastoma: la forma hereditaria, por la transmisión de un gen mutado de padres a hijos y lo constituyen aproximadamente 40% de los casos, y la forma no hereditaria que constituye el 60% de los casos

El signo más frecuente es la leucocoria que se caracteriza por presentar pupila blanca en uno o ambos ojos, también puede presentar estrabismo o hemorragia en el globo ocular. El tratamiento más eficaz es la enucleación, que consiste en la extirpación del globo ocular afectado, y aunque es bastante drástico, incrementa sus posibilidades de curación y supervivencia, sobre todo si el tumor no ha generado metástasis. La quimioterapia es otro tipo de tratamiento utilizado para facilitar la enucleación, o en combinación con láser o radioterapia para tratar de salvar la visión; particularmente se emplea en casos metastásicos sin embargo la falta de respuesta a este tratamiento conduce a la progresión de la enfermedad y muerte del paciente. En otros tipos de tumores malignos se ha reportado que el fracaso de la quimioterapia involucra la sobreexpresión de los tres transportadores de la familia ABC formada por 49 genes. Se trata de proteínas con amplia distribución en tejidos del cuerpo humano y transportan activamente sustratos de alta especificidad principalmente metabolitos contribuyendo a la detoxificación celular.

El objetivo de este trabajo fue determinar si los transportadores ABCB1, ABCC1 y ABCG2 están expresados en el tejido tumoral y explorar si existe alguna correlación con la lateralidad y el género de los pacientes.

Palabras clave: Retinoblastoma, expresión de los transportadores ABC, antígeno-anticuerpo e inmunohistoquímica

1. Introducción y Antecedentes

1.1 Retinoblastoma

El retinoblastoma (Rb) es una neoplasia maligna que se produce durante la infancia temprana, el diagnóstico se realiza entre el nacimiento y los 3 y 4 años de edad; su incidencia varía en distintas poblaciones y en México se estima una tasa de 1 en 15,000 nacidos vivos (Fajardo-Gutiérrez, 2011)

El retinoblastoma se puede presentar en dos formas: hereditaria y no hereditaria. Los casos no heredados constituyen el 60% y la mayoría tienen entre tres años y seis años al momento de ser diagnosticados, el tumor se manifiesta de forma unilateral a causa de mutaciones somáticas en ambos alelos del gen RB1 en células retinianas inmaduras, aunque el 15% de los pacientes con retinoblastoma unilateral tienen el tipo hereditario (Shields, et al., 1991).

Estos niños no tienen un riesgo aumentado de desarrollar segundos tumores malignos, y si llega a la vida adulta y procrean, el riesgo que sus hijos desarrollen retinoblastoma es casi igual al de la población general.

En contraste, los casos hereditarios son diagnosticados a una edad más temprana, generalmente dentro de los primeros 12 meses de vida, constituyen el 40% de los casos de los cuales el 10% tienen padre o madre afectada. En los pacientes que padecen la forma hereditaria, se producen múltiples tumores comúnmente en ambos ojos e incluso los tumores están presentes al momento del nacimiento (Dimaras et al., 2015). Las personas afectadas por esta forma de retinoblastoma tienen un riesgo aumentado de desarrollar otros tipos de tumores malignos como sarcomas, melanomas, cáncer de cerebro y cavidad nasal (Fletcher et al., 2004) (Mantela et al., 2005), y además si alcanzan la vida adulta y procrean el producto de cada embarazo tiene casi el 50% de riesgo de desarrollar la enfermedad.

La aparición del retinoblastoma está asociada a la ausencia genética o funcional del gen de susceptibilidad al retinoblastoma que se ubica en el brazo largo del cromosoma 13. El producto de este gen es la proteína pRb de 110 KD, la cual tiene un papel esencial en el control del ciclo celular.

1.2 Epidemiología

El retinoblastoma es un tipo de cáncer que afecta a uno de cada 15 000 niños nacidos vivos en México (Fajardo-Gutiérrez, 2011). En los Estados Unidos, la incidencia se estima en 3.6 casos por cada millón de niños menores de 6 años. La incidencia de retinoblastoma hereditario es notablemente constante entre las diversas poblaciones del mundo. El retinoblastoma no hereditario y unilateral parece ocurrir con mayor frecuencia en regiones más pobres, tropicales y subtropicales del mundo (Chintagumpala, et al., 2007)

Las neoplasias malignas en los adultos son diferentes de las de los niños. Entre los adultos predominan las neoplasias de tipo epitelial, es decir, los carcinomas y alcanzan una frecuencia de 80%. En contraste en los menores de 15 años predominan los de tipo no epitelial con una frecuencia del 92%, y solo con un 8% los tumores de tipo epitelial y entre los 15 y 19 años ocurre una transición. El retinoblastoma tiene características tan peculiares que se clasifica en un grupo epidemiológico independiente de los demás tumores malignos en niños.

Las neoplasias en niños se dividen en 12 grupos:

- I. Leucemias
- II. Linfomas y otras neoplasias retículo endoteliales
- III. Tumores del sistema nervioso central
- IV. Tumores del sistema nervioso simpático
- V. Retinoblastoma
- VI. Tumores renales
- VII Tumores hepáticos
- VIII Tumores óseos
- IX Tumores de los tejidos blandos
- X Tumores de células germinales, trofoblásticas y otras células gonadales
- XI Carcinomas y otras neoplasias epiteliales malignas
- XII Otras neoplasias malignas inespecíficas

1.3 Etiología

Según la hipótesis del “doble impacto”, propuesta por Knudson en la década de los 70’s establece que son necesarias dos mutaciones para el desarrollo de esta enfermedad. En la forma hereditaria, la primera mutación es germinal es decir afecta todas las células del cuerpo, esta hipótesis propuso que el gen mutado confiere a estos pacientes la predisposición a desarrollar retinoblastoma y posteriormente otros tumores malignos (Knudson, 1971). Esta hipótesis propone un “segundo impacto” que se refiere a una segunda mutación genética, producida posteriormente como una mutación somática, es decir localmente en los retinoblastos, que ya portaban la mutación adquirida congénitamente. Para la forma unilateral no heredada, propuso que ambas mutaciones se producen en una célula somática de la retina. El retinoblastoma entonces, se origina cuando en alguna célula de la retina, ambos alelos de este gen sufren mutaciones que inactivan la función de la proteína que codifica este gen (pRb). Hoy en día ese gen ha sido identificado y se le conoce como el gen de susceptibilidad al retinoblastoma, cuyo símbolo es RB1 en humanos.

La conclusión de Knudson fue que las células de los retinoblastomas no tienen un gen mutante, sino dos por lo menos (Knudson, 1971)

Aunque en la mayoría de los casos de retinoblastoma se han encontrado mutaciones en el gen RB1, se ha reportado que en algunos casos de retinoblastomas unilaterales no hereditarios que tienen un gen RB1 intacto, lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo para la inactivación de pRb. Se han sugerido mecanismos epigenéticos de silenciamiento del promotor del gene o un posible agente viral oncogénico (Orjuela et al., 2000).

1.4 Biología molecular del gen RB1 / pRb

El gen de susceptibilidad al retinoblastoma RB1 fue el primer gen supresor de tumores identificado hace ya más de tres décadas. Su ausencia está asociada a la aparición del tumor. Este gen fue identificado mediante clonación posicional a partir de las pérdidas ocurridas en el brazo largo del cromosoma 13 observadas en células de retinoblastomas hereditarios (Friend et al., 1986).

El gen supresor RB1 se localiza en el cromosoma 13q14.2, tiene una longitud de 180,388 pares de bases y está formado por 27 exones (Figura 1). Codifica para un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que se traduce en una fosfoproteína nuclear (pRB) de 110 kDa que inhibe la proliferación celular de la fase G1 a la fase de síntesis del ciclo celular (Ramasubram et al., 2012) (Instituto Nacional de la Nutrición (Mexico), et al., 2005)(Chintagumpala et al., 2007)

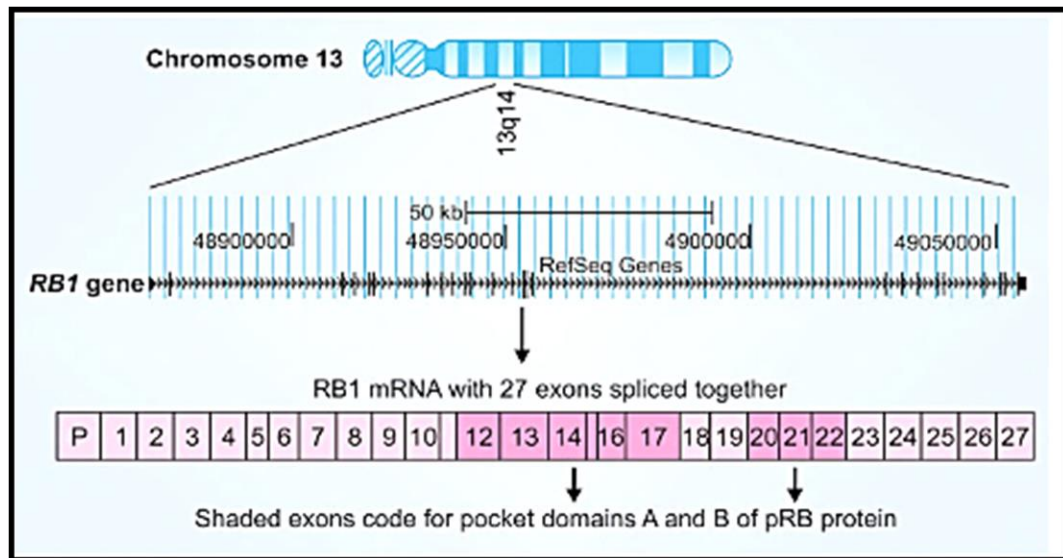


Figura 1 Esquematización del cromosoma 13 (Ramasubramanian et al., 2012)

1.5 Biología molecular de la proteína pRB

La proteína pRB está formada por 928 aminoácidos, desempeña un papel importante en la regulación del ciclo celular. Esta proteína tiene la capacidad de unirse e interactuar con una gran variedad de proteínas celulares y esta función está determinada por su estado de fosforilación (Brantley, et al., 2002). Existen evidencias a nivel bioquímico de que la forma no fosforilada de pRb es responsable de la interrupción de la proliferación celular. Cuando pRb está hipofosforilada tiene alta afinidad por los factores de transcripción de la familia E2F/DP. Los complejos proteicos Rb-E2F inhiben la transcripción de los genes requeridos para atravesar el punto G1/S del ciclo celular (Ramasubramanian, et al., 2012). Su función inhibitoria

se anula cuando pRb sufre fosforilación mediada por los complejos CDK-ciclina. La proteína pRb permanece fosforilada durante las fases S, G2 y M del ciclo celular y el movimiento de estos fosfatos es efectuada por un complejo de fosfatasas después de completarse la mitosis (Lodish et al., 2016). La desfosforilación restituye pRb a su estado de alta afinidad por los factores de transcripción y provoca la detención de la proliferación celular.

Esta ruta de señalización, tiene gran relevancia ya que existen alteraciones en diversos componentes de la ruta en prácticamente todos los tumores malignos en adultos

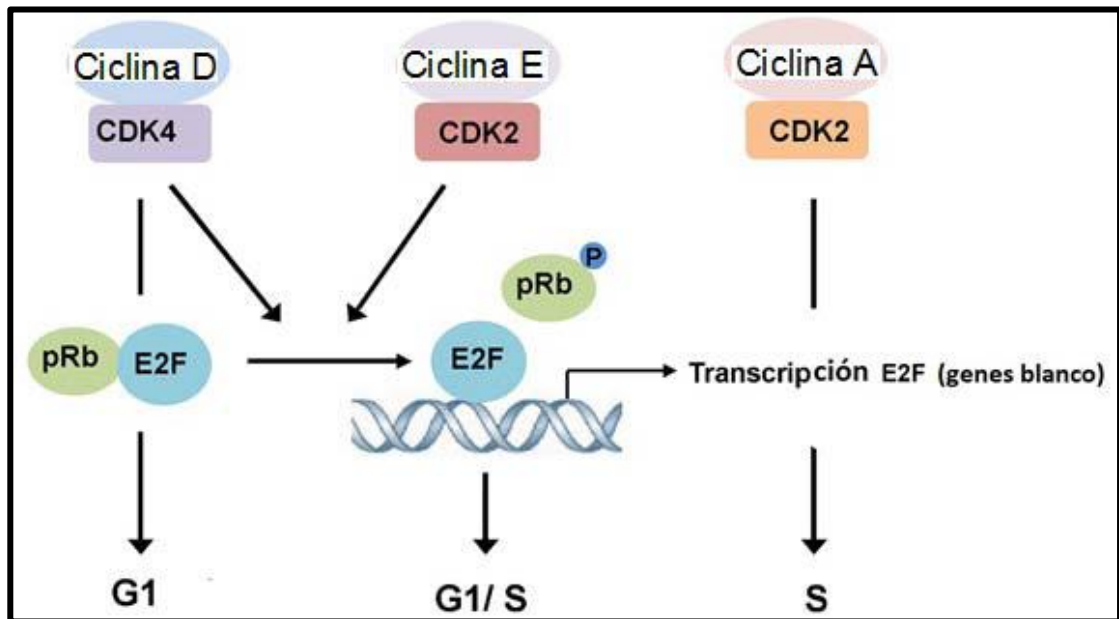


Figura 2 Genes involucrados en la transición G1/S del ciclo celular. Si se suprime el complejo ciclina D/CDK4, ciclina E/CDK2 suprime la fosforilación de Rb y la actividad transcripcional de E2F, conduciendo a la detención del ciclo celular y a la inhibición del crecimiento (Del, Lagunas Cruz, et al., 2014)

2. Histología del Retinoblastoma

Los retinoblastomas muestran diversos grados de diferenciación, esto es evidente por la formación de rosetas y existen tres tipos de rosetas descritas en retinoblastoma: 1) rosetas de Flexner-Wintersteiner, 2) rosetas de Homer-Wright y 3) rosetas de diferenciación fotorreceptora (floreteas) (Ramasubramanian, et al., 2012) (Christopher D.M Fletcher, n.d.). Véase figura 3

Las rosetas de Flexner-Wintersteiner, fueron descritas por primera vez por el médico patólogo Simón Flexner y años más tarde el oftalmólogo Austriaco Hugo Wintersteiner sugirió que los grupos de células parecían bastones y conos. Las rosetas forman agrupaciones de células semejantes a una rosa y se componen de un anillo que rodea un lumen central vacío y salen prolongaciones de células cuboidales(Christopher D.M Fletcher, n.d.)(Rodriguez-Galindo, et al., 2015).

Rosetas Homer-Wright, fueron descritas por primera vez por James Homer Wright. Estas rosetas se encuentran en una variedad de tumores neuroblásticos, además de retinoblastoma las rosetas Homer Wright carecen de un lumen central, sin embargo, tiene una maraña central de filamentos englobados.

Las rosetas conocidas con el nombre de Diferenciación fotorreceptora, se encuentran aproximadamente en el 15-20% de los retinoblastomas. Se caracteriza por la presencia de agregados de fotorreceptores neoplásicos denominados Fleurettes. Los Fleurettes, son células de retinoblastoma que se han sometido a una mayor diferenciación de fotorreceptores y se agrupan en una especie de ramo, carecen de mitosis o necrosis. (Rodriguez-Galindo et al., 2015)(Ramasubramanian, et al. 2012)

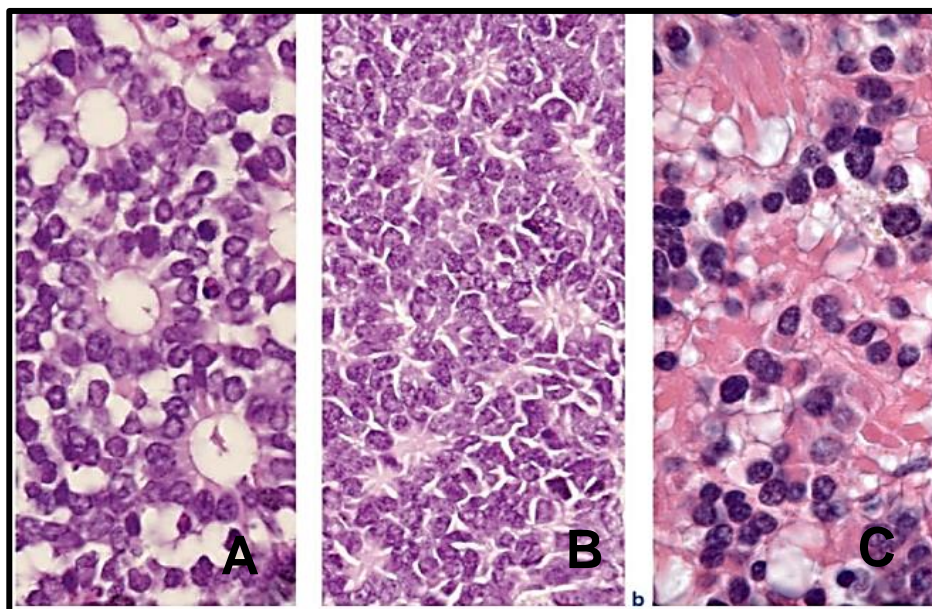


Figura 3 En la imagen se puede apreciar la formación característica de células tumorales en rosetas y fleurettes. En la figura (A) se muestran las rosetas de Flexner-Wintersteiner que muestran un centro vacío. En la figura (B) se muestran rosetas de Homer Wright con un centro relleno de prolongaciones celulares citoplasmáticas y por último en la figura (C) están los Fleurettes bien diferenciados. Las Floretas son estructuras que se asemejan a grupos de fotorreceptores.(Rodríguez-Galindo et al., 2015)

2.1 Manifestaciones Clínicas

Los síntomas que se presentan son la leucocoria que se caracteriza por un reflejo blanco en la pupila; el segundo síntoma más común y puede acompañar o preceder a la leucocoria es el estrabismo que se caracteriza por la desviación del globo ocular.

Otros síntomas que se pueden presentar son: hiperemia ocular, dolor, disminución de la visión, inflamación del tejido que rodea el ojo, pupila engrandecida o dilatada, o cambio en el color del iris signo llamado heterocromia. Por estas razones, cuando un niño presenta leucocoria o estrabismo es importante que sea revisado por un oftalmólogo (Rodríguez-Galindo et al., 2015). El retinoblastoma se presenta casi por igual en ambos géneros. El diagnóstico clínico se lleva a cabo con estudios de imagen como tomografía computarizada y ultrasonido y se confirma mediante el análisis histopatológico del globo ocular enucleado (Parulekar, 2010)

2.2 Estratificación

Una vez que se diagnostica un retinoblastoma, la primera opción terapéutica para la mayoría de los casos es la enucleación, que consiste en la extirpación del globo ocular. Una vez que se confirmó histopatológicamente el retinoblastoma, se establece un estadio clínico para determinar si existe o no enfermedad extraocular tomando en cuenta los siguientes aspectos: presencia de células tumorales en el borde quirúrgico, infiltración del tumor en coroides y en nervio óptico.

Actualmente existen varios sistemas de clasificación para Rb, en primer lugar, el Rb se categoriza como una enfermedad intraocular o extraocular. El Rb intraocular se refiere a que el tumor se encuentra dentro del globo ocular y el Rb extraocular se refiere al hallazgo de evidencias del tumor más allá del globo ocular, (Espinoza, 2011). Estas clasificaciones son importantes porque los tratamientos dependen del grado de avance de la enfermedad.

La clasificación Reese-Ellsworth, está basada en la estadificación del tumor intraocular y predicción del globo ocular. Este sistema se divide en 5 grupos (I a V) con respecto al tamaño del tumor (Tabla 1). El grupo I tienen el menor riesgo de enucleación y el grupo V con mayor riesgo de enucleación (Rd Kiss, et al., 2008)

Tabla 1 Clasificación Reese- Ellsworth. Tomada y modificada (Rd Kiss et al.,2008.)

Grupo	Pronóstico	Especificaciones
I	Muy favorable	Tumor solitario menor a 3 mm
II	Favorable	Tumor solitario mayor a 3 mm
III	Poco Favorable	Tumores bien definidos con simbra vítreo
IV	Desfavorable	Tumores mal definidos con siembra vítreo. Desprendimiento de retina
V	Muy desfavorable	Tumores masivos que ocupan mas del 50% del globo ocular con presencia de simbre vítreo

2.3 Tratamiento

El tratamiento del retinoblastoma tiene por objeto primero salvar la vida y si es posible preservar la visión, y, por lo tanto, los factores que deben ser considerados para el tratamiento son la lateralidad, tamaño del tumor, presencia de siembra vítrea, localización y la estratificación intraocular y extraocular (Chintagumpala et al., 2007), es decir, la extensión de la enfermedad.

La enucleación es el tratamiento más eficaz, que consiste en la extirpación del ojo quirúrgicamente. Esto es necesario porque es la única oportunidad de quitar completamente el tumor si este no se ha extendido fuera del ojo. En los casos bilaterales, el ojo con enfermedad más avanzada es enucleado y el menos afectado recibe quimioterapia (Ramasubramanian, et al., 2012) (Chintagumpala et al., 2007)(Rodriguez-Galindo, et al., 2010) . Cuando ambos ojos están implicados, algunas veces se extirpa el que está más comprometido, mientras que el otro ojo es tratado con tratamientos que intentan preservar la visión. Lamentablemente, algunas veces el retinoblastoma se ha extendido más allá del ojo, requiriendo quimioterapia para su control. Una vez que las células tumorales han alcanzado la línea de resección quirúrgica del nervio óptico la tasa de mortalidad es del 50% al 85%. El retinoblastoma es un tumor muy agresivo y una vez que se ha diseminado fuera del ojo, la supervivencia es muy baja (Rd Kiss et al., 2008.)

Radioterapia: el retinoblastoma es un tumor radiosensible, su efecto es debido a la inducción de la muerte celular. La radioterapia se utiliza para tratar retinoblastoma avanzado. Las complicaciones más importantes a largo plazo son el desarrollo de tumores inducidos por radiación, principalmente sarcomas (Ramasubramanian, et al., 2012) (Chintagumpala et al., 2007) (Rodriguez-Galindo, et al., 2010). Sin embargo, la radioterapia tiene un excelente historial en la preservación del ojo en pacientes con Resse-Ellsworth del grupo I-II (Rodriguez-Galindo et al., 2015).

Terapias focales, incluyen el láser verde de argón, laser de diodo, la crioterapia, la braquiterapia e inyecciones perioculares. Las terapias están basadas

en la localización y tamaño del tumor (Rodriguez-Galindo et al., 2015) (Ramasubramanian, et al., 2012a)

Crioterapia: Es un tratamiento utilizado para tumores anteriores pequeños (Tolentino, et al., 1972). Consiste en aplicar un pulso de frío con una temperatura de -70°C lo que congela y mata al tumor en secciones periódicas. (Rodriguez-Galindo et al., 2015) (Tolentino, et al., 1972)

Braquiterapia: Es una terapia utilizada para tumores demasiados grandes y que por su localización no se pueden tratar con láser.

El retinoblastoma es una enfermedad muy quimiosensible, en general la quimioterapia está indicada en pacientes con enfermedad extraocular, sin embargo, también para la forma intraocular, con el objetivo de disminuir el tamaño del tumor antes de la enucleación. Los pacientes con enfermedad extraocular tienen mal pronóstico, aunque pueden beneficiarse de la combinación de quimioterapia convencional y radioterapia en dosis altas. Actualmente, los agentes farmacológicos más eficientes son la combinación de vincristina y carboplatino para el tratamiento de tumores intraoculares (Rodriguez-Galindo et al., 2003) (Jo et al., 2017). También puede ser utilizada en pacientes con enfermedad unilateral cuando los tumores son pequeños.

Existe un problema muy importante con la quimioterapia, ya que no elimina por completo las células cancerosas, lo que no permite la erradicación total del tumor. (Rodriguez-Galindo et al., 2015) (Kleinerman, et al., 2012)

3. Mecanismos moleculares de quimio resistencia en cáncer

El cáncer es una enfermedad que no solo se caracteriza por el crecimiento incontrolado de una masa de células tumorales, sino alteraciones dinámicas en el genoma que si no se controla conduce a la interrupción de procesos biológicos normales a través de la invasión celular de tejidos y órganos a través de la metástasis (Zheng, 2017) (Abdullah, et al., 2013)

Actualmente, la quimioterapia es a menudo el tratamiento estándar en muchos tipos de tumores malignos. Es capaz de inducir la muerte celular en tumores y reducir la masa tumoral, pero muchos pacientes con cáncer experimentan la recurrencia y la muerte debido al fracaso al tratamiento. Ahora sabemos que existen mecanismos de quimiorresistencia que en algunos casos dan lugar a la supervivencia de células tumorales y conduce a la recurrencia después del tratamiento (Abdullah, et al., 2013) (Zheng, 2017).

Las proteínas relacionadas con la quimiorresistencia pueden ser ligandos extracelulares, receptores de membrana, señales citósolicas, mensajeros y factores de transcripción celular. Estas proteínas están involucradas en varios eventos y procesos biológicos incluyendo apoptosis, proliferación, autofagia, biología de exosomas, proteínas ABC y de células troncales, entre otros (Figura 4)

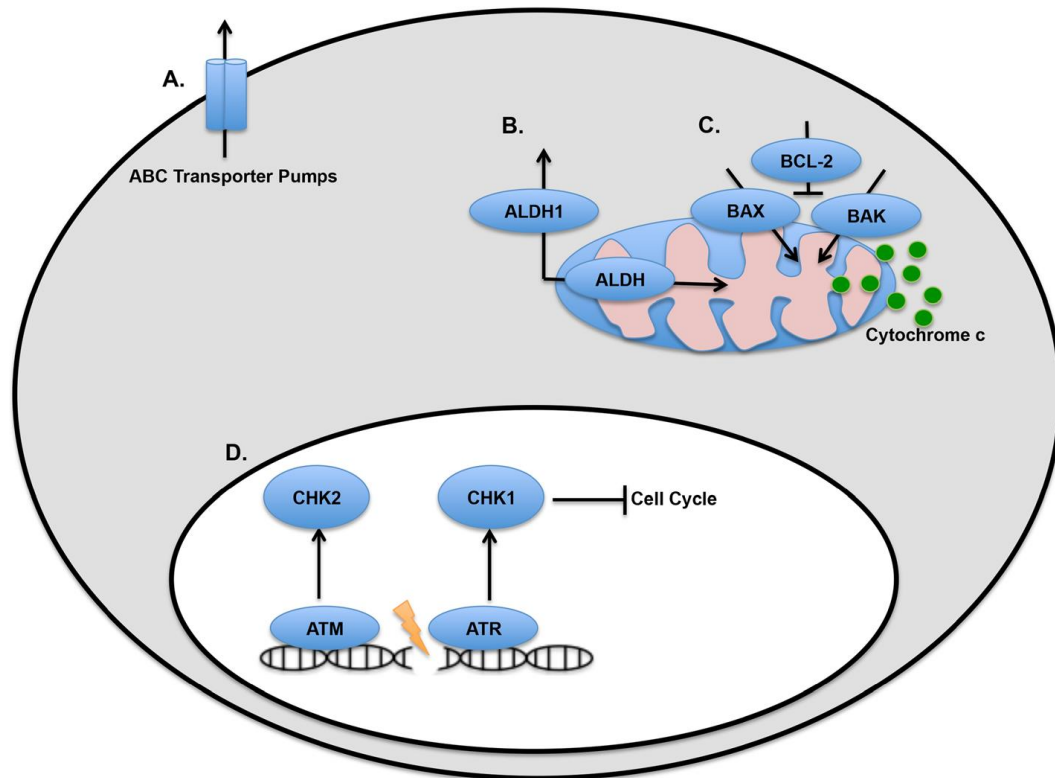


Figura 4 Proteínas implicadas en la quimiorresistencia del cáncer. A) Los transportadores ABC expulsan una amplia variedad de quimioterapéuticos. B) Señales citósolicas que tienen el papel de sustrato para los fármacos. C) Proteínas a favor de la supervivencia

utilizando mecanismos para evitar la apoptosis en mitocondria. D) Activación de proteínas reparadores de DNA (Abdullah, et al., 2013)

3.1 Autofagia

La autofagia se encarga de degradar organelos o partículas celulares dañadas y recicla aminoácidos o ácidos grasos a través del autofagosoma. Así mismo, el estrés celular y el aumento metabólico son activadas por la autofagia, cuya adaptación puede promover la supervivencia celular y causar el crecimiento celular y la resistencia terapéutica (Zheng, 2017).

3.2 Células troncales del cáncer

Las células troncales del cáncer (CSC del inglés Cancer Stem Cells), son una subpoblación de células capaces de formar tumores, de auto renovación, de resistencia a fármacos y de diferenciación múltiple. Se ha demostrado en otros tipos de cáncer que las CSC son capaces de escapar a los efectos tóxicos de la quimioterapia a través de una variedad de mecanismos (Abdullah, et al., 2013).

3.3 Transportadores ABC

Las proteínas ABC, son responsables de la translocación de diversos sustratos tales como iones, péptidos, xenobióticos entre otros a través de la hidrólisis de ATP en las membranas celulares. Se ha reportado la sobreexpresión de los transportadores ABCB1 y ABCG2 en tumores hematológicos y sólidos, como la leucemia, neuroblastoma, cáncer de mama y cáncer de ovario, en donde se ha demostrado su participación en la quimio resistencia (Zheng, 2017) (Abdullah, et al., 2013).

4. Transportadores ABC

Los transportadores ABC son proteínas integrales de membrana altamente conservadas que se pueden dividir en cuatro tipos: los canales iónicos, los transportadores, las acuaporinas y las bombas dependientes de ATP(Linton, 2007)

En los seres humanos, hay 49 genes ABC conocidos y clasificados en siete familias diferentes (A-G) dependiendo de su secuencia de aminoácidos y, finalmente, los dominios de las proteínas: ABCA (13 miembros), ABCB (11 miembros), ABCC (11 miembros), ABCD (4 miembros), ABCE (1 miembros), ABCF (3 miembros), y ABCG (5 miembros) (El-Awady et al., 2017).

Estas proteínas se denominan ABC (ATP Binding Cassette; por sus siglas en inglés) debido a que poseen dos dominios de unión a ATP los cuales han sido conservados a lo largo de su proceso evolutivo. Dichas proteínas de unión a ATP utilizan energía liberada por la hidrólisis de ATP para mover sustratos a través de las membranas dentro o fuera de las células. Generalmente se clasifican en importadores y exportadores, en función de la dirección de transporte con respecto al citoplasma (Lizzet et al., 2010) (Linton, 2007)

Las proteínas transportadoras acarrean diferentes compuestos, se encuentran una gran cantidad de componentes hidrofóbicos, azúcares, grasas, aminoácidos, péptidos, proteínas y medicamentos, a través de las membranas celulares. Se ha demostrado que los transportadores ABC están involucrados en la resistencia a toxinas y xenobióticos; además si las moléculas no se transportan correctamente pueden no estar disponibles donde se requieren y pueden causar daños a las células. Las mutaciones en los transportadores ABC causan diferentes desórdenes de tipo Mendeliano tales como fibrosis quística, degeneración retiniana, alteraciones en el transporte de colesterol entre otros (Tabla 2) (Lizzet et al., 2010) (Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, et al., 2008) (Linton, 2007)

Tabla 2 Funciones que desempeñan los transportadores ABC y las consecuencias que causan si sufren daño en su funcionamiento. Tomada y modificada (Vasiliou, et al., 2009)

Gen	Función	Enfermedad
ABCA2	Resistencia a fármacos	Desconocida
ABCA4	Transportador de fotoreceptores	Desconocida
ABCB1	Resistencia a fármacos	Desconocido
ABCB2	Transportador de péptidos	Deficiencia inmune
ABCB3	Transportador de péptidos	Deficiencia inmune
ABCB4	Transportador de ácido biliar	Colestasis intrahepática
ABCB6	Transportador de metales	Desconocida
ABCB7	Transportador de ácido biliar	Anemia
ABCC1	Resistencia a fármacos	Desconocida
ABCC2	Transportador de ácido biliar	Síndrome Dubin Johnson
ABCC7	Canal iónico de cloro	Fibrosis Quística
ABCC8	Receptor de Sulfonilurea	Desconocida
ABCE1	Proteína de Unión a Oligoadelinato	Desconocida
ABCG1	Transportador de colesterol	Desconocida
ABCG2	Resistencia a fármacos	Desconocida
ABCG5	Transportador de esteroides	Sitosterolemia
ABCG8	Transportador de esteroides	Sitosterolemia

Las proteínas ABC poseen un cassette de unión al ATP conocido como dominio de unión al nucleótido (NBD, por sus siglas en inglés “Nucleotide Binding Domain”). El NBD contiene varios dominios altamente conservados, entre ellos las secuencias Walker A, Walker B, el bucle H y el circuito Q (Figura 5). El dominio Walker A es una horquilla rica en glicina, seguida de una alfa hélice; esta estructura permite la unión electrostática del ATP y el dominio Walker B provee el residuo carboxilato que coordina y estabiliza el Mg^{2+} , el cual es un cofactor en la hidrólisis de ATP (El-Awady et al., 2017)(Lizzet et al., 2010)

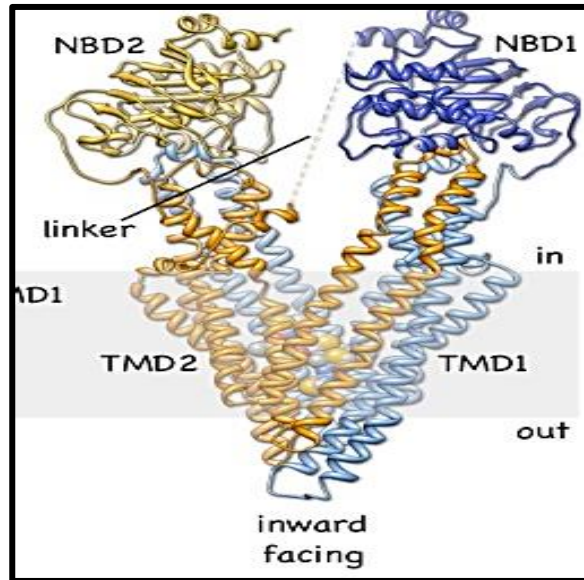


Figura 5 Estructura de los transportadores ABC orientada hacia el interior. Está conformado por dos dominios transmembranales (TMD's) y dos dominios de unión al ATP (NBD's). (Wilkins, 2015)

Los transportadores ABC contienen dominios transmembrana (TMD), están formados cada uno por seis hélices hidrofóbicas que atraviesan la membrana y es la que determina la especificidad hacia el sustrato. La unión de los TMD forma un canal que permite la translocación del sustrato a través de la membrana (Lizzet et al., 2010) (Dean, et al., 2001). Los dos NBD's se unen y juntos hidrolizan ATP, mientras que el TMD participa en el reconocimiento del sustrato y la translocación a través de la membrana lipídica

El mecanismo de translocación de los transportadores ABC, se lleva a cabo cuando dos moléculas de ATP se unen a los NBDs. La energía liberada por la formación del dímero NBD cerrado causa un cambio conformacional en los TMD. La hidrólisis de ATP desencadena la disolución del dímero NBD cerrado, lo que da como resultado cambios conformacionales adicionales en los TMD. Finalmente, la liberación de fosfato y ADP restaura el transportador a la conformación abierta del dímero NBD listo para el ciclo posterior

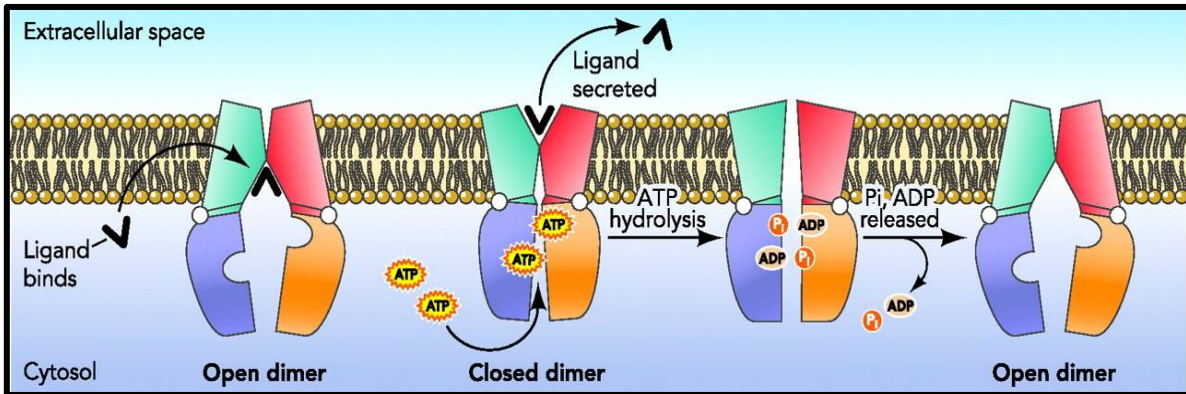


Figura 6 Mecanismo de translocación a través de la membrana lipídica (Linton, 2007)

4.1 Resistencia a fármacos

La mayoría de los tumores sólidos generan resistencia a múltiples agentes quimio terapéuticos, con estructura química y mecanismos de acción diferentes. Este fenómeno fue descrito y conocido como resistencia a múltiples drogas o MDR (“Multidrug Resistance” por sus siglas en inglés) (Sánchez-Suárez, et al., 2006) (Glavinas, et al., 2004)

Las proteínas llamadas de “resistencia a múltiples fármacos” fueron descubiertas como transportadores de membrana produciendo resistencia a la quimioterapia en el cáncer.

A mediados de los 70’s, los oncólogos se dieron cuenta que ciertos tumores muestran un patrón de resistencia inherente desde el inicio del tratamiento, mientras que otros desarrollaban resistencia durante el transcurso del tratamiento.

Los miembros involucrados en MDR son los transportadores ABCB1 (también conocida como P-gp), ABCC1 (MRP), y ABCG2 (BCRP) tienen una gran importancia en el flujo de salida de una gran variedad de fármacos.

Esta resistencia se correlaciona con la sobreexpresión de proteínas ABC que actúan como bombas que expulsan los fármacos del interior celular, esto significa que las células tumorales que se hacen resistentes a un medicamento, se hacen al mismo tiempo resistente a otros medicamentos. (Glavinas et al., 2004).

4.2 Transportadores ABC implicados en la resistencia a fármacos

Subfamilia ABCB

Estas subfamilias se localizan en diferentes compartimientos de la membrana, incluyendo la membrana plasmática, el retículo endoplasmático y membranas mitocondriales. Esta subfamilia tiene 11 genes que se expresan únicamente en mamíferos, varios de los miembros de la familia B se conoce que confiere resistencia a múltiples fármacos en las células del cáncer (Tabla 3) (Glavinas et al., 2004)

Tabla 3 Subfamilia de los genes ABCB, su ubicación y principales funciones. Tomada y modificada (Glavinas et al., 2004)

Familia	Miembro	Ubicación	Función
ABCB	ABCB1		
	ABCB2		
	ABCB3	Cerebro	
	ABCB4	Riñón	Transporte de hierro
	ABCB5	Corazón	Transporte de péptidos del
	ABCB6	Hígado	retículo endoplásmico
	ABCB7	Mitocondria	<u>Resistencia a drogas</u>
	ABCB8	Retículo endoplásmico	
	ABCB9		
	ABCB10		
	ABCB11		

4.3 ABCB1

El gen ABCB1 fue clonado en 1986 (Roninson et al., 1986) aislaron las secuencias que llamaron MDR1 y MDR2 en el gen MDR de un hámster chino y encontraron que la resistencia a múltiples fármacos estaba correlacionada con la amplificación de dos secuencias de ADN, denominadas como MDR1 y MDR2.

Posteriormente en otro estudio, mostraron que en células de carcinoma KB humanas muestran resistencia en colchicina, vinblastina y está asociado con la amplificación de DNA y el aumento de la expresión en el gen ABCB1 en sublíneas resistentes a múltiples fármacos de células de leucemia humano y carcinoma de ovario (Shen et al., 1986). Concluyeron que la sobreexpresión del gen ABCB1 parece ser una característica recurrente en las células de mamíferos que muestran resistencia a múltiples fármacos contra el cáncer (Riordan et al., n.d.) (Kartner, et al., n.d.).

ABCB1 (MDR1/PgP), es un transportador de membrana que se encuentra en los riñones, placenta, hígado, intestino, glándulas suprarrenales y barrera hematoencefálica y tiene el papel más crítico en el flujo de medicamentos y la resistencia a la quimioterapia (Kathawala, et al., 2015) (Silva et al., 2015). ABCB1, es un transportador de sustratos y medicamentos hidrófobos que incluyen medicamentos como la colchicina, vinblastina y adriamicina, así como xenobióticos (Dean et al., 2001).

Este gen codifica para la proteína MDR1/PgP, se encuentra localizado en el cromosoma 7 en la posición q21.1 (Figura 7) (Callen, et al., 1987).

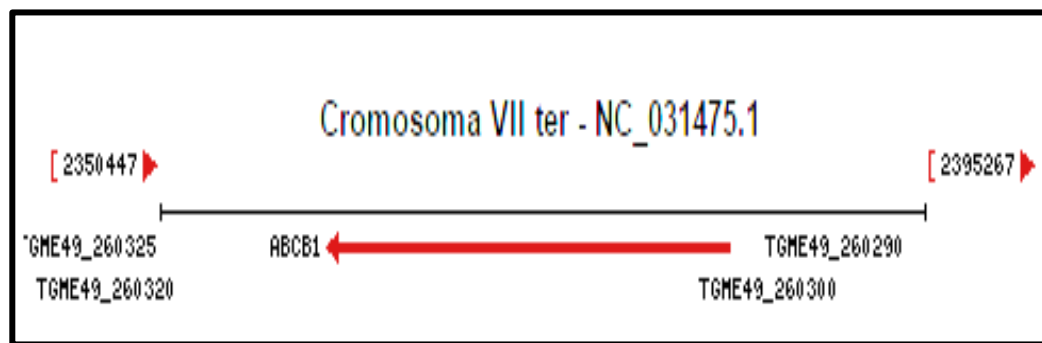


Figura 7 Esquemática de la localización del gen ABCB1 en el cromosoma 7 (Baguet, et al. 1976)

Subfamilia ABCC

Esta subfamilia está compuesta por 12 miembros que son similares en su estructura. Esta subfamilia incluye transportadores activos dependientes de ATP y moduladores de la permeabilidad de potasio. Además, esta subfamilia se asocia con una amplia gama de funciones incluyendo la desintoxicación (ABCB1, ABCC1), contra xenobióticos y estrés oxidativo. Véase en la tabla 4 (Glavinas et al., 2004)

Tabla 4 Subfamilia de los genes ABCC, su ubicación y sus principales funciones. Tomada y modificada (Glavinas et al., 2004)

Familia	Miembro	Ubicación	Función
ABCC	ABCC1		Transporte de iones orgánicos Transporte de nucleótidos <u>Resistencia a drogas</u>
	ABCC2		
	ABCC3		
	ABCC4	Pulmón	
	ABCC5	Próstata	
	ABCC6	Corazón	
	ABCC7	Hígado	
	ABCC8	Riñón	
	ABCC9	Musculo	
	ABCC10	Páncreas	
	ABCC11		
	ABCC12		

4.4 ABCC1

La proteína de resistencia a multidrogas (MRP1/ABCC1) de 190kDa fue identificada por Cole en 1992 (Cole et al., 1994) por su sobreexpresión en células de cáncer de pulmón. La sobreexpresión de la proteína ABCC mostró resistencia a doxorubicina, etoposido y vincristina debido al aumento del flujo de salida celular de medicamentos. (Shukalek et al., 2016) (Cole et al., 1994).

ABCC1 es un transportador miembro de la subfamilia MRP que participan en la resistencia a múltiples fármacos, la proteína MRP1 se encuentra en el pulmón,

testículos y las células mononucleares de sangre periférica; además de su capacidad para conferir resistencia en las células tumorales (Leslie, et al., 2001)

La función de la proteína ABCC1 es transportar de aniones orgánicos mutispecíficos, conjugados de sulfato de hormonas esteroides y sales biliares. Este gen se encuentra en el cromosoma 16p13.1 (Figura 8), se extiende por lo menos 200kb y contiene 31 exones.

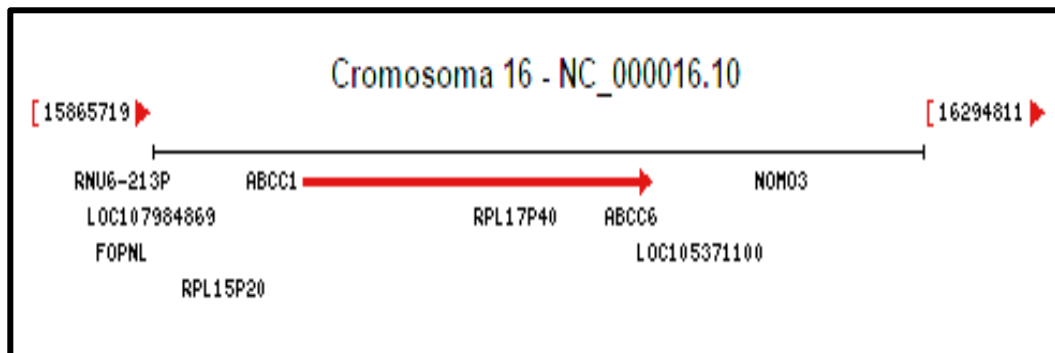


Figura 8 Esquematización del gen ABCC1 en el cromosoma 16 (Miller, et al., n.d.)

Subfamilia ABCG

Subfamilia que tiene un arreglo de dominio único, con NBD's situado en el extremo N-terminal y TMDS, situada en el extremo C-terminal. El primer miembro descrito en esta subfamilia fue el homólogo humano de la *Drosophila* ABCG1. (Tabla 5)

Tabla 5 Subfamilia de los genes ABCG2, su ubicación y sus principales funciones. Tomada y modificada (Glavinas et al., 2004)

Familia	Miembro	Ubicación	Función
ABCG	ABCG1	Placenta Hígado Intestino	Transporte de colesterol Transporte de esteroides <u>Resistencia a drogas</u>
	ABCG2		
	ABCG3		
	ABCG4		
	ABCG5		
	ABCG6		
	ABCG7		
	ABCG8		

4.5 ABCG2

El gen ABCG2 (BCRP), es transportador de xenobióticos que desempeña un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos de un cáncer de mama específico y desde entonces se ha demostrado que confiere resistencia a múltiples fármacos en varias células cancerosas (Doyle et al., 1998).

Doyle y colaboradores (Doyle et al., 1998) encontraron que la expresión del cDNA de BCRP en células de cáncer de mama MCF-7 confiere resistencia a la mitoxantrona, doxorubicina y daunorubicina..

Este gen transportador de la familia ABC, está altamente expresado en la placenta, así como en una variedad de tejidos normales, incluyendo el riñón e intestinos. Su principal función es transportar xenobióticos.

Este gen contiene 16 exones y abarca más de 66kb, se encuentra localizado en el cromosoma 4 en la posición q22.1 y codifica para una proteína de 663 aminoácidos (Allikmets, et al., 1998) (Figura 9).

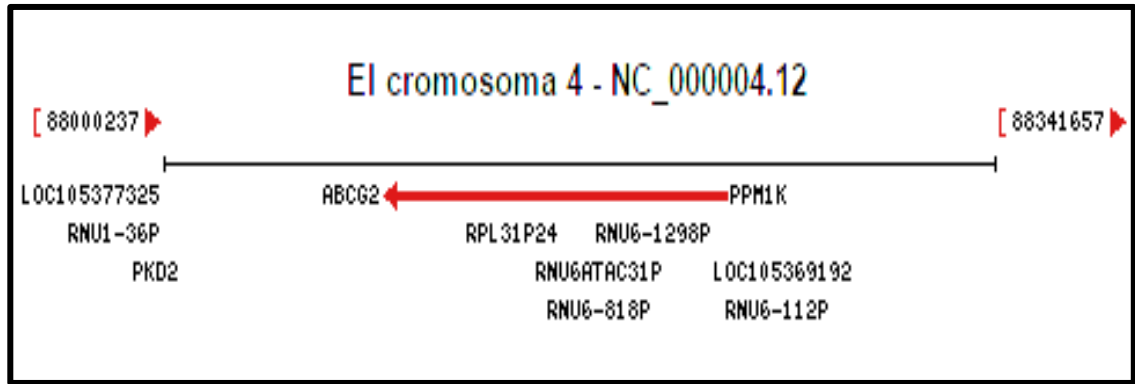


Figura 9 Esquemización del gen ABCG2 en el cromosoma 4 (Suárez, et al., 1976)

4.6 Transportadores ABC y retinoblastoma

En el 2004 (Krishnakumar et al., 2004) estudiaron la correlación de la expresión de ABCB1 por inmunohistoquímica en 60 retinoblastomas. Como resultado obtuvieron que no existe correlación entre la expresión del transportador ABCB1. Posteriormente en un estudio realizado en el 2006 (Wilson et al., 2006), estudiaron la expresión en 16 muestras de los transportadores ABCB1, ABCC1 y ABCG2 en retinoblastomas tratados con enucleación. Únicamente tres tumores expresaron más de un transportador ABC.

En los estudios realizados el número de casos en sus muestras es de 60 por lo que se considera un número de muestras bastante pequeña y no existe algún estudio que correlacione los datos clínicos con la expresión de las proteínas ABC.

5. Justificación

El primer obstáculo al que se enfrenta todo tratamiento farmacológico en el cáncer es la resistencia a múltiples drogas, mecanismo en el cual están implicadas las proteínas ABC y no existen datos sobre la expresión de las proteínas en estos casos de retinoblastoma de México y los estudios realizados con respecto a la asociación de datos clínicos con la expresión de las proteínas ABC tienen un tamaño de muestra de 60 casos. Además de aportar conocimiento sobre la biología del fenómeno de quimiorresistencia en retinoblastoma, el análisis de estas proteínas

en tumores primarios puede aportar información sobre el potencial de emplearse como biomarcadores de agresividad tumoral.

6. Planteamiento del problema

¿Se expresan los genes ABCB1, ABCC1 y ABCG2 en retinoblastomas primarios?

7. Objetivo General:

7.1 Determinar la expresión de los transportadores ABCB1, ABCC1 y ABCG2 en retinoblastomas primarios unilaterales y bilaterales por la técnica de inmunohistoquímica.

8. Objetivos Particulares:

8.1 Realizar microarreglos de tejidos como herramienta de mediana densidad para evaluar si las proteínas ABCB1, C1 y G2 se expresan o no en retinoblastomas primarios.

8.2 Llevar a cabo tinciones de inmunohistoquímica sobre los microarreglos usando anticuerpos contra los transportadores ABCB1, ABCC1 y ABCG2.

8.3 Determinar si existe correlación de los hallazgos moleculares con datos clínicos de los pacientes correspondientes a lateralidad y género.

9. Hipótesis

Los genes ABCB1, ABCC1 y ABCG2 están expresados en retinoblastomas primarios.

10. Método

10.1 Tejidos tumorales

Los tejidos tumorales provienen de ojos enucleados como parte del tratamiento quirúrgico que reciben los pacientes afectados por retinoblastoma que han sido atendidos tanto en el Hospital de Pediatría del Centro Médico SXXI del IMSS como del Hospital Infantil de México Federico Gómez de la Secretaría de Salud desde al año de 1998 hasta el 2015. En estas piezas quirúrgicas que forman parte de los archivos de los servicios de patología se realizan los análisis y diagnósticos histopatológicos determinando el tamaño del tumor, la extensión y las estructuras oculares afectadas, sobre todo si el nervio óptico ya fue invadido por células malignas. Con esta información se establece la extensión de la enfermedad, y en gran medida de esto dependen tratamientos adicionales después de la enucleación

Esta colección constituye un biobanco y está compuesto por bloques de parafina en donde se encuentran embebidos los ojos enucleados fijados previamente en formol así como laminillas correspondientes con tinción hematoxilina- eosina. Los casos analizados fueron coleccionados en el periodo de 1998 hasta 2015.

Los datos clínicos considerados son diagnóstico, lateralidad y género y se recabaron en los archivos y expedientes clínicos de ambos hospitales. Se documentaron todos los casos de retinoblastoma que se presentaron en los años ya mencionados.

10.2 Microarreglos

Los microarreglos de tejidos (MAT) consisten en bloques de parafina llamados receptores, en los cuales se pueden colocar cientos de cilindros de tejidos provenientes de bloques llamados donadores, arreglados de tal manera que se

pueden realizar tinciones de inmunohistoquímica (IHQ) de muchos tejidos en una sola laminilla. Es una técnica de mediano rendimiento.

Para hacer los microarreglos, primeramente, se diseñaron 6 mapas que cuentan con 90 ubicaciones considerando triplicados de cada caso y en cada microarreglo se consideraron dos ubicaciones de tejido sano (hígado y apéndice) para usarse como controles positivos de las inmunotinciones. Con la finalidad de facilitar la ubicación de los tejidos se utilizó un sistema de coordenadas de letras y números como se muestra en la Figura 10.

Los microarreglos están integrados solo con casos unilaterales o solo bilaterales a excepción del mapa número uno que se realizó previamente.

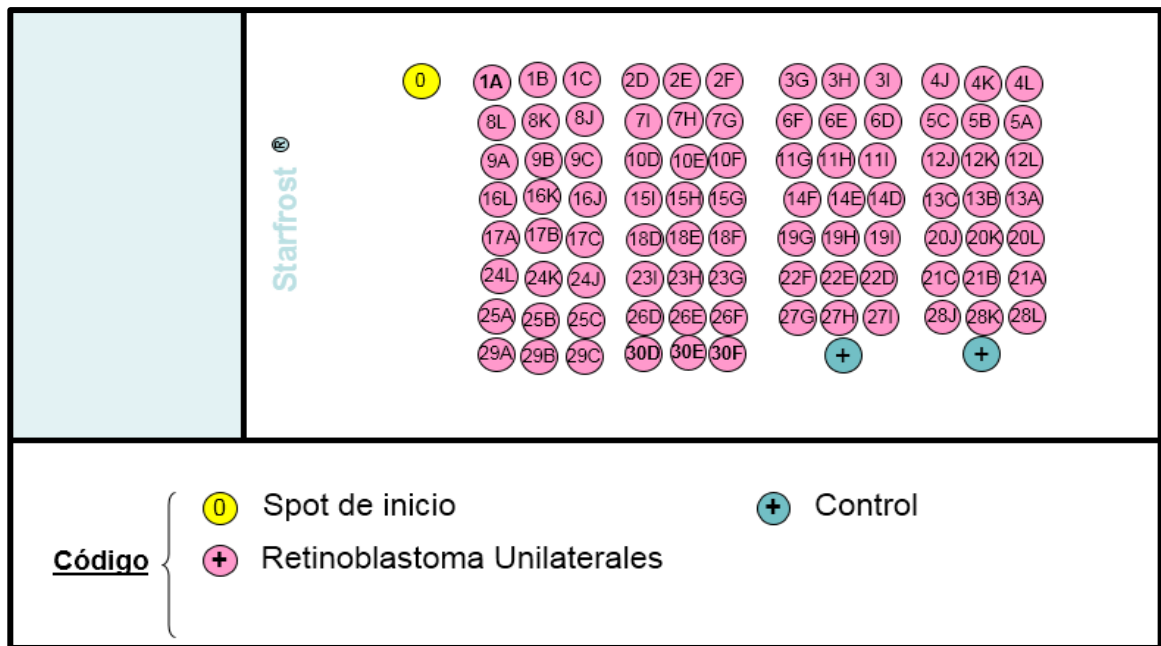


Figura 10 Diseño del mapa de los microarreglos

Para hacer los microarreglos de tejidos, las laminillas de ojos con retinoblastoma teñidas con hematoxilina y eosina fueron punteadas en tres sitios en donde se ubicó tejido viable al momento de la fijación. Usando un microarreglador se empalmaron la laminilla punteada con el bloque de parafina correspondiente para retirar con una aguja pequeños cilindros de tejido del bloque donador y se colocaron

en el bloque receptor en el mismo orden en el que se encuentran distribuidos en el mapa diseñado con anterioridad

10.3 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ), es una técnica que consiste en la detección y localización de antígenos *in situ* utilizando anticuerpos. Se requiere crear las condiciones óptimas para que se produzca la unión específica antígeno-anticuerpo. Para detectar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizan enzimas que se revelan utilizando sustratos o cromógenos que se precipitan y generan una coloración café-marrón.

Para realizar la inmunotinción de los tres transportadores ABC, se obtuvieron tres secciones de 3 micras por cada microarreglo con un total de 18 laminillas. Estas 18 laminillas se desparafinaron en un horno a 60° C durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron con xilol y se hidrataron con lavados en alcoholes de mayor a menor concentración.

Los tejidos fueron sometidos al recuperador antigénico con un amortiguador de citrato con pH 6 en una olla presión durante 40 minutos. El objetivo de esta reacción es desenmascarar los epítomos mediante calor y presión. El siguiente paso fue el bloqueo de peroxidasa con peróxido de hidrógeno al 3%

Los sitios inespecíficos se bloquearon incubando las laminillas con el bloqueador universal de caballo (Horse Blocking Universal, Vector) al 2.5% durante 20 minutos. Posteriormente se colocó cada anticuerpo primario diluidos 1:100 durante 30 minutos. Para la identificación de la proteína ABCB1 se utilizó el anticuerpo secundario policlonal de conejo (HPA02199, SIGMA), para la proteína ABCC1 se empleó el anticuerpo secundario monoclonal de ratón (AB24102, ABCAM) y por último se usó el anticuerpo secundario monoclonal de ratón (GTX23380, GENTEX) para la proteína ABCG2

El revelado se llevó a cabo con 100µl de diaminobencidina durante 30 segundos, que produce un compuesto colorido color café que se precipita en el sitio de la reacción antígeno-anticuerpo. Finalizado el procedimiento las laminillas se contratiñeron con hematoxilina y se montaron para su observación al microscopio.

11. Análisis Histológico

Las laminillas sometidas a inmunohistoquímica fueron escaneadas con el digitalizador de imágenes Aperio y se analizaron con el programa Aperio ImageScope obteniendo imágenes digitales nítidas y de alta resolución para observar y documentar las áreas y detalles de interés. Estas imágenes fueron analizadas por un patólogo y la tinción en las células tumorales se evaluó cualitativamente como positiva o negativa con una escala de cruces: una cruz baja intensidad, dos cruces intensidad media y tres cruces intensidad alta.

Posteriormente, se analizaron las estructuras subcelulares teñidas para evaluar si las estructuras teñidas son consistentes con los sitios donde se encuentran presentes las proteínas ABC

12. Análisis Estadístico

Para analizar si existen relaciones entre la expresión de estos transportadores con los datos de género y lateralidad, se empleó el programa IBM SPSS STATISTICS 25. Con este programa obtuvimos tablas de frecuencia que sirvieron para la descripción y ordenamiento de las variables en categorías. También se obtuvieron tablas cruzadas que sirvieron para analizar el comportamiento de las variables de interés de acuerdo con la combinación o cruce de categorías.

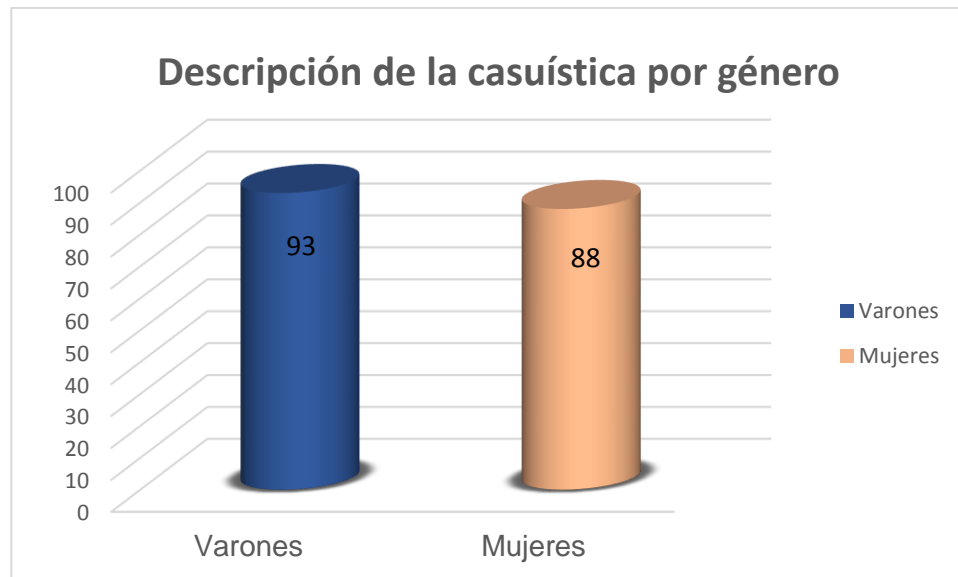
La prueba chi cuadrada, se utilizó para determinar si existe alguna asociación entre los datos clínicos con la presencia o ausencia de cada una de las proteínas ABC. El tamaño de la muestra fue de $n= 181$, y se consideró $p<0.05$ como significativos, para cada una de las variables del estudio. Las variables

independientes son el género y la lateralidad, la variable dependiente es la presencia o ausencia de las proteínas ABCB1, ABCC1 y ABCG2.

Posteriormente, se utilizó la prueba razón de momios para calcular las proporciones de probabilidad que existen entre los datos clínicos y la expresión de los transportadores. Por último, se realizó un análisis multivariado con la finalidad de conocer cuántos de los 181 casos expresaron un solo transportador o múltiples transportadores. Además, se obtuvo el estadio oncológico con el propósito de hallar alguna asociación con la expresión de los transportadores

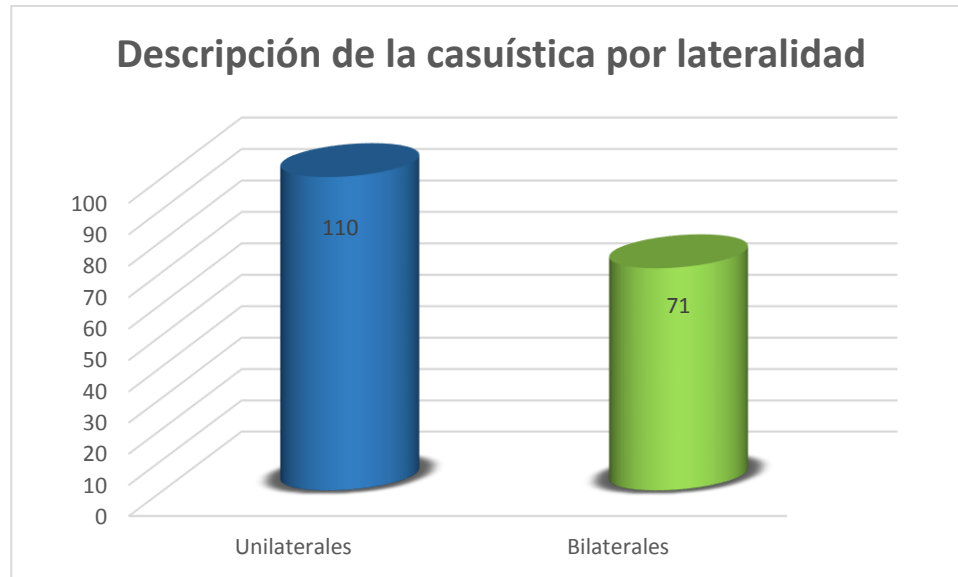
13. Resultados

Fueron analizados 181 casos diagnosticados con retinoblastoma en el Hospital de Pediatría y en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, de los cuales 93 son niños y 88 son niñas (Gráfica 1).



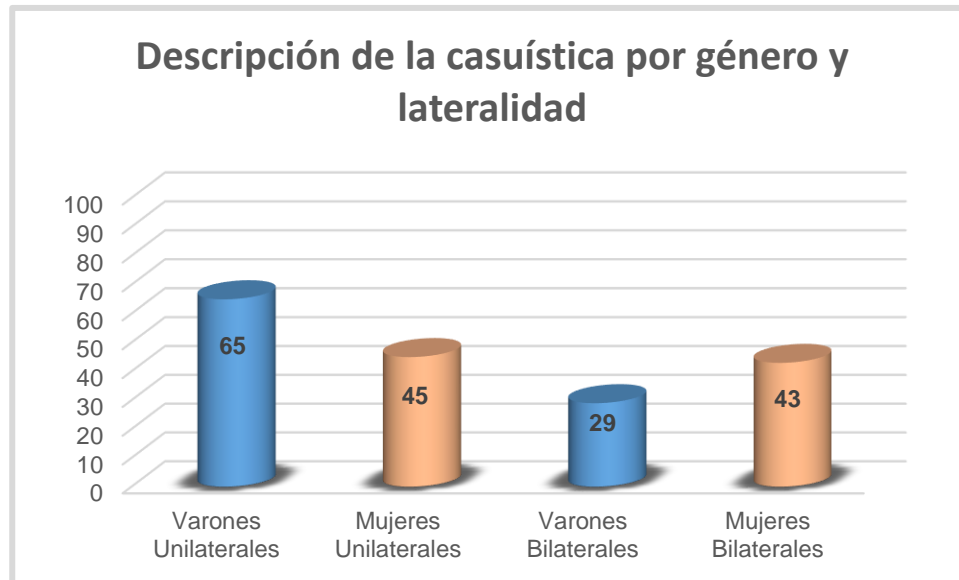
Gráfica 1 En la gráfica se muestra el total de varones y mujeres que se incluyeron en este estudio

De los 181 casos incluidos en el estudio, 110 casos fueron unilaterales y 71 casos fueron bilaterales. Véase en la gráfica 2



Gráfica 2 En la gráfica se muestra el total de casos unilaterales y bilaterales que se incluyeron en este estudio

De los 181 casos diagnosticados con retinoblastoma, 65 casos fueron niños unilaterales y 28 niños bilaterales; 45 casos fueron niñas unilaterales y 43 niñas fueron bilaterales (Gráfica 3). Sobresale una cantidad menor de varones bilaterales en comparación con las niñas bilaterales.



Gráfica 3 Total de varones y mujeres con su correspondiente lateralidad

Cada microarreglo cuenta con un total de 30 casos con triplicados, dando un total de 90 discos por microarreglo. Se obtuvieron un total de 1 638 discos en las 18 laminillas. Sin embargo, se perdieron durante las inmunotinciones 680 discos, conservándose 958 tejidos informativos que equivalen a un 58.4% de discos conservados.

13.1 Expresión de las proteínas ABCB1, ABCC1 y ABCG2 en tejidos controles

Para este estudio se utilizó apéndice e hígado como tejidos controles, debido que en estos tejidos las proteínas ABC se expresan y mostraron la tinción esperada como se puede apreciar en las figuras 11-13

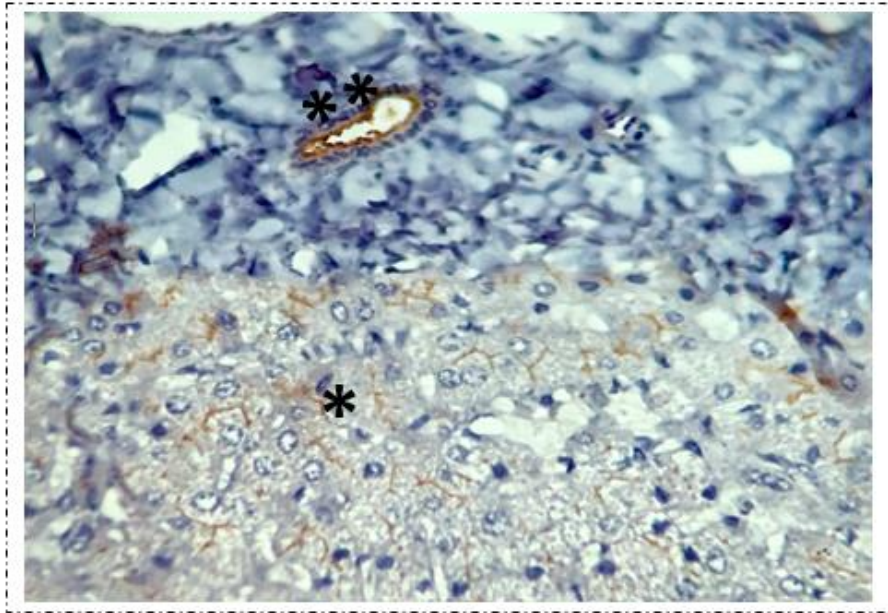


Figura 11 Hígado control para evaluar la expresión del transportador ABCB1. Endotelio vascular con tinción de color café en el citoplasma **. Tinción positiva en la membrana de hepatocitos * . Inmunohistoquímica 20x aumento original

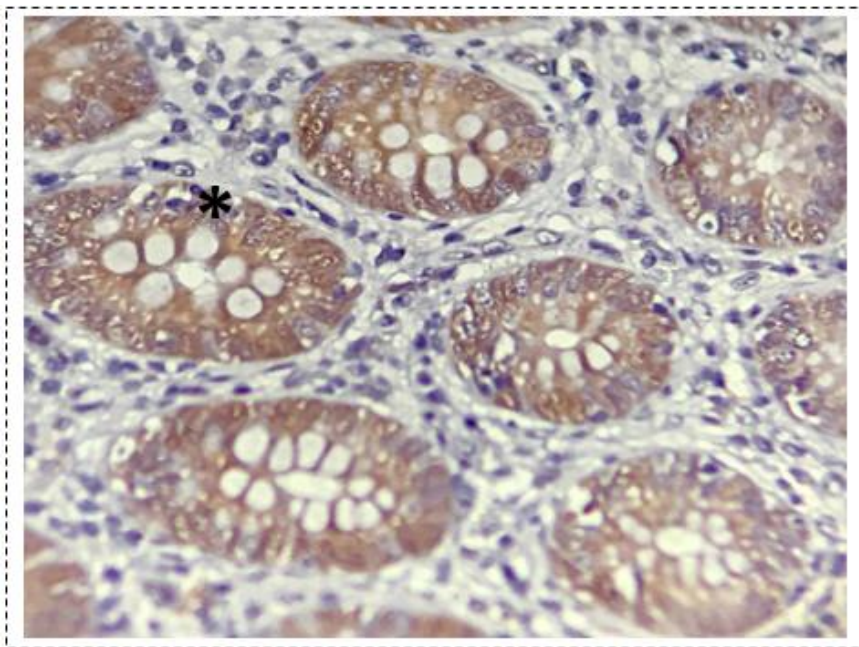


Figura 12 Apéndice cecal control positivo para el transportador ABCC1. En las células epiteliales de las criptas los colonocitos presentan expresión para ABCC1 en el citoplasma *. Inmunotinción 40x aumento original

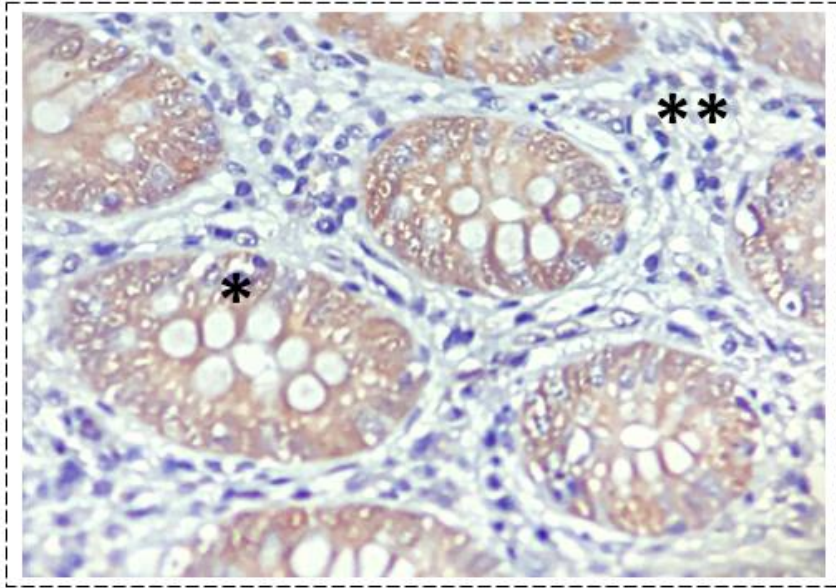


Figura 13 Apéndice cecal control para evaluar la expresión del transportador ABCG2. Se observa de color café la expresión en el citoplasma de células epiteliales *. Nótese la ausencia de expresión en células del estroma **. Inmunotinción 40x aumento original

13.2 Expresión de las proteínas ABC

Las Inmunotinciones de tejidos controles y tumorales (Rb) fueron escaneadas con un digitalizador de marca Aperio para evaluar la expresión de las proteínas ABC, y posteriormente se analizaron las imágenes de alta resolución obtenidas con el programa ImageScope (Figuras 14-17)

A continuación, las imágenes obtenidas de los tejidos tumorales y la expresión de cada transportador.

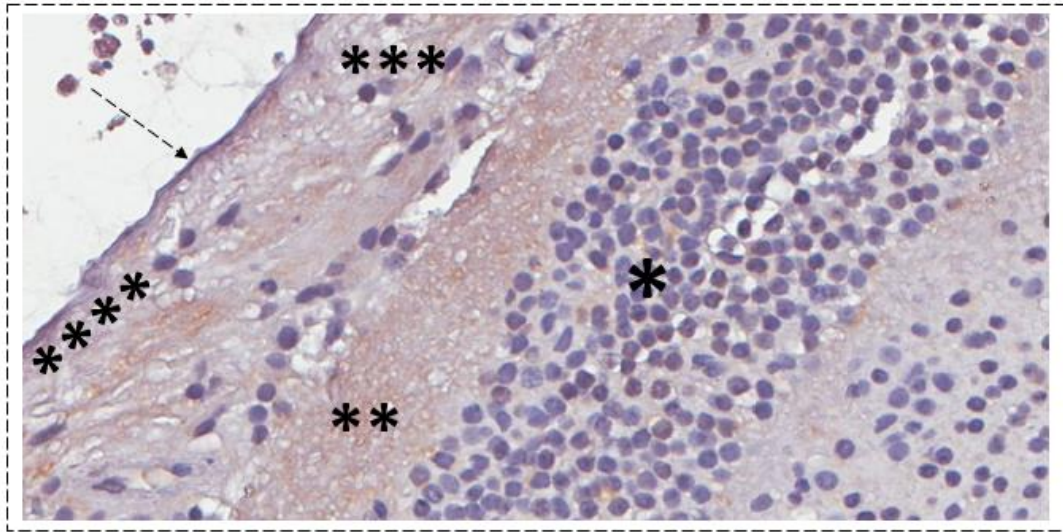


Figura 14 En la retina no tumoral se observó tinción positiva para el transportador ABCG2 en las fibras nerviosas de la capa limitante externa**** y en capa de fibras nerviosa . En la capa de células ganglionares *** y en la capa plexiforme externa ** no hay tinción en el núcleo ni en el citoplasma de las células. En las células de la capa nuclear externa muestra expresión en el citoplasma *. Inmunotinción 40x aumento original.

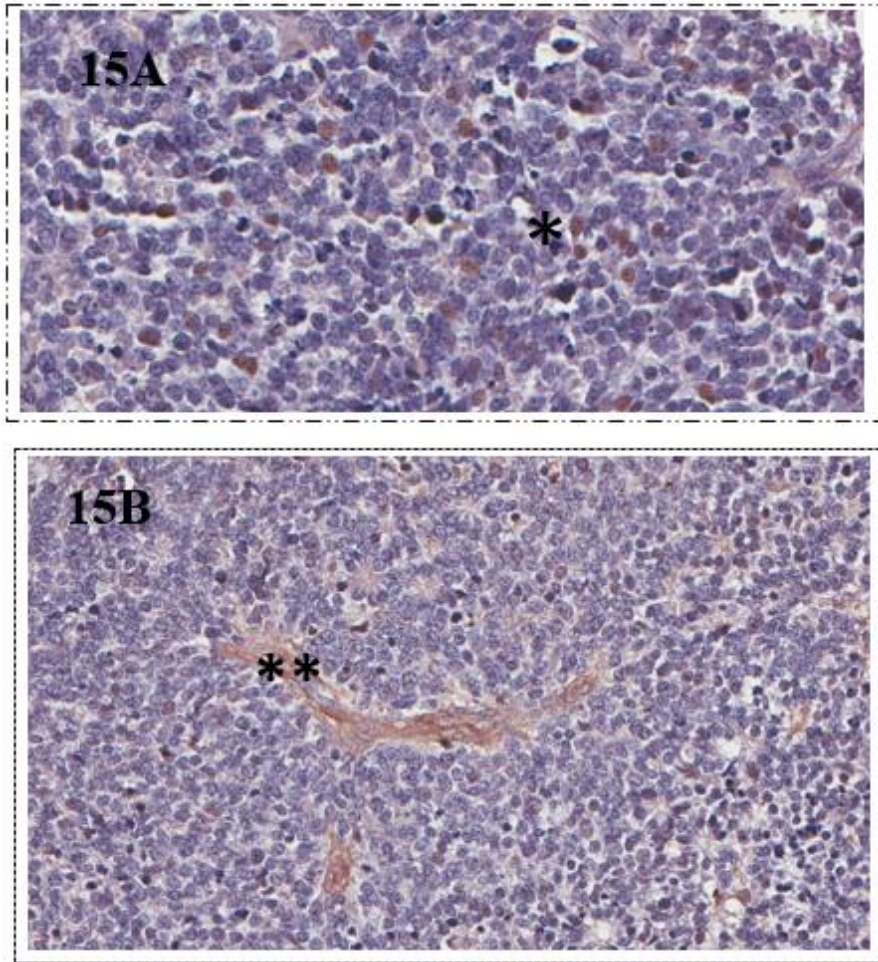


Figura 15 Inmunotinción en retinoblastoma de las células tumorales son positivas para ABCB1 en los núcleos * y en el citoplasma de las células endoteliales vasculares **. Inmunotinción 20x aumento original.

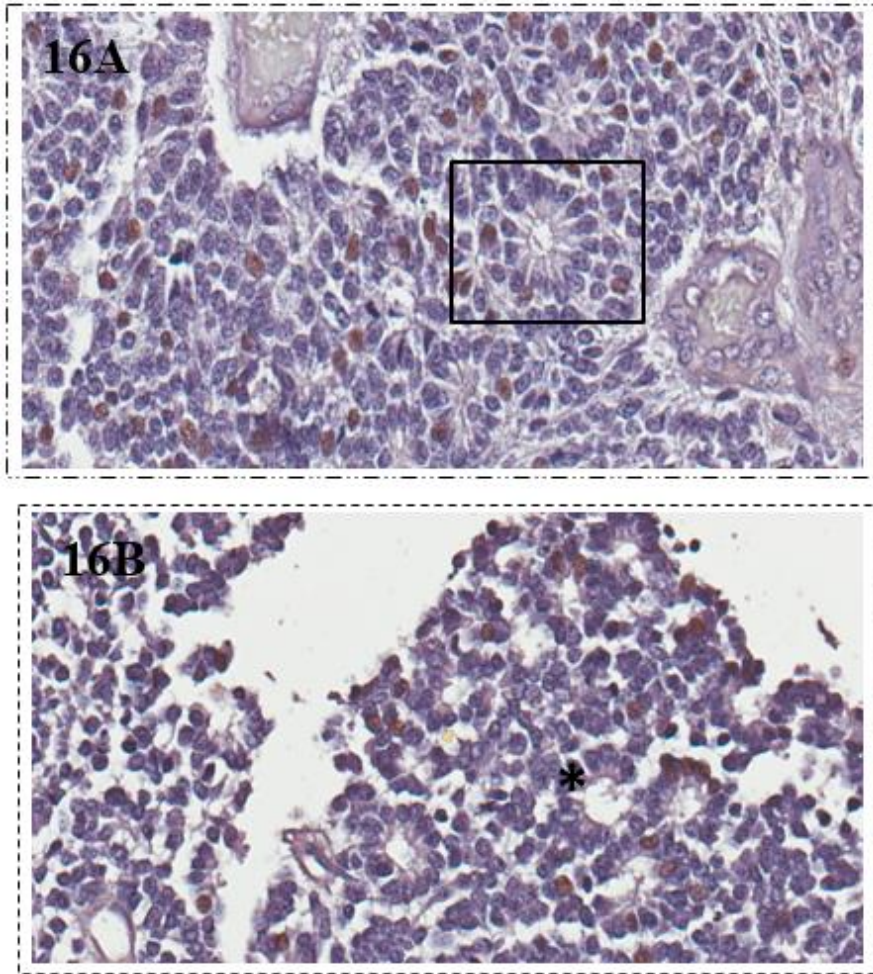


Figura 16 Inmunotinción en retinoblastoma de células tumorales contra el anticuerpo ABCC1. (A) En el recuadro se muestra roseta de Flexner-Wintersteiner (B) Se observan rosetas Homer Wright con algunos núcleos positivos *. Inmunotinción 40x aumento original

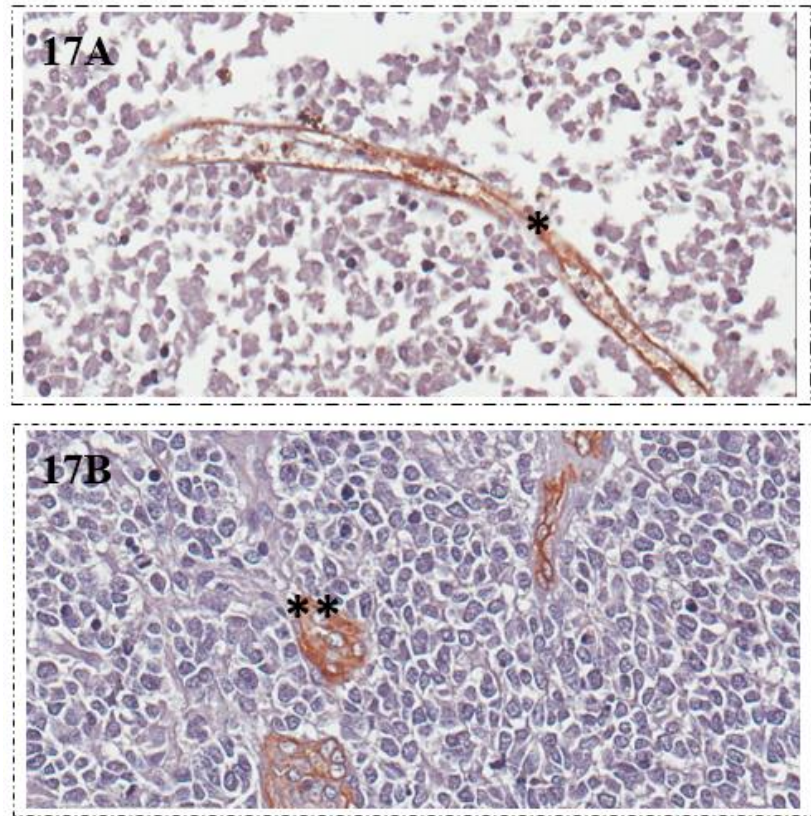


Figura 17 Inmunotinción de células tumorales contra el anticuerpo ABCG2. Las células en este tumor son necróticas, y no expresan al transportador ABCG2, sin embargo, la tinción es positiva en el citoplasma de las células endoteliales a lo largo de un vaso sanguíneo *. (B) el transportador se expresa en células endoteliales en citoplasma y tiene una expresión negativa en células tumorales **

13.3 Resumen de Hallazgos Inmunohistoquímicos

Los resultados se resumen en la tabla 6, se especifica el nivel de expresión de cada uno de los transportadores representado con cruces; una cruz es baja expresión, dos cruces media expresión y tres cruces significa alta expresión.

La expresión del transportador ABCB1 estuvo presente en 55 (30%) de 181 casos, mientras que la expresión de ABCC1 se observó en 35 (19%) de 181 casos y ABCG2 en 60 (33 %) siendo el transportador con el mayor número de casos expresados. Por último, 101 casos (55 %) de los tumores presentaron tinción positiva y 80 casos (44%) presentaron una tinción negativa. Véase tabla 7.

Posteriormente, observamos que 60 retinoblastomas (33%) a nivel global que expresan solo un transportador y 41 retinoblastomas (22%) expresan al menos dos transportadores. Véase tabla 8. Finalmente, nuestros resultados arrojaron que 33 retinoblastomas expresan dos transportadores y 8 casos que expresan múltiples transportadores (tabla 9)

Considerando que la expresión de varios transportadores podría estar relacionada con tumores más agresivos, obtuvimos el estadio oncológico de los 181 casos, sin embargo, no pudimos encontrar ninguna relación ya que la mayor parte de los casos incluidos en este estudio encuentran en estadio II.

Tabla 6 Resumen de los hallazgos Inmunohistoquímicos. Una cruz significa poca expresión, dos cruces significa que tiene expresión media y tres cruces tiene expresión alta, las observaciones fueron realizadas por un médico patólogo

	*	**	***	Total de casos	Porcentaje
ABCB1	14	19	22	55/181	30%
ABCC1	8	16	11	35/181	19%
ABCG2	11	22	27	60/181	33%

Tabla 7 Expresión global positiva y negativa de los transportadores ABC

	Total de casos	Porcentaje
Positivos	101	55%
Negativos	80	44%

Tabla 8 Expresión de uno o más transportadores en retinoblastomas

	Total de Casos	Porcentaje
Positivos (1transportador)	60Rbs	33%
Positivos (>1transportador)	41Rbs	22%

Tabla 9 Resultados de la expresión doble o múltiple de los transportadores ABC en retinoblastomas

B1/C1	B1/G2	C1/G2	B1, C1, G2
4	17	12	8

13.4 Asociación de datos clínicos

Para analizar la posible relación entre la expresión de los transportadores y la lateralidad o el género, se generaron primeramente tablas de frecuencia con el paquete estadístico IBM SPSS STATISTICS 25. En la tabla 9 se puede apreciar que hay un mayor porcentaje de casos bilaterales expresando el transportador ABCB1 con un porcentaje de 39.4%.

Tabla 10 Asociación de los datos clínicos con la expresión de cada transportador ABC

ABC	Género		Lateralidad	
	Masculino	Femenino	Unilateral	Bilateral
ABCB1	26%	30.6%	20.9%	39.4%
ABCC1	21.5%	17.0%	21.8%	15.4%
ABCG2	35.4%	29.5%	31.8%	33.8%

En la prueba de chi cuadrada no arrojó valores significativos para esta asociación, sin embargo, la prueba de razón de momios si se obtuvo un valor

significativo de 2.46 en casos bilaterales asociados al transportador ABCB1. Esto quiere decir, que existe 2.46 veces mayor probabilidad que el transportador ABCB1 se expresó en casos bilaterales que en casos unilaterales. (Tabla 10)

Tabla 11 Se muestran los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas

ABC	Chi Cuadrada			Momios			
	Género	Lateralidad	p*	Género	OR (95% CI)	Lateralidad	OR (95% CI)
ABCB1	0.531	7.319	<0.05	1.273	.66-2.43	2.463	1.27-4.77
ABCC1	0.577	1.107	<0.05	0.75	.356-1.57	0.657	.299-1.44
ABCG2	0.726	0.77	<0.05	0.762	.408-1.42	1.094	.580-2.06

* χ^2

14. Discusión

El retinoblastoma es el tumor maligno más frecuente en niños, que afecta 1 de cada 15,000 nacidos vivos (Fajardo-Gutiérrez, 2011). El tratamiento quirúrgico es un tratamiento casi siempre curativo, sin embargo, en México hasta en un 15% de los casos, el tumor se ha extendido más allá del globo ocular y requieren tratamientos adicionales como quimioterapia o radioterapia. Desafortunadamente, la resistencia a los medicamentos es una barrera fundamental en el tratamiento del retinoblastoma (Shukla et al., 2017) (Krishnakumar et al., 2004) (Chan, et al., 1991) y la mayoría de los pacientes con enfermedad extraocular muere a pesar del tratamiento.

Algunas células cancerosas generan simultáneamente resistencia a diferentes medicamentos (Resistencia multidrogas), por tal motivo, hay un fracaso en la respuesta de la quimioterapia (Gottesman, et al., 2002). Entre los mecanismos relacionados a la quimiorresistencia se incluyen la sobre expresión de los transportadores ABC. Las tinciones que se realizaron, indican que más de la mitad (55%) es decir 101 de los casos analizados presentan expresión para alguno de los transportadores.

Respecto a las estructuras donde se expresan estos transportadores observamos que el transportador ABCB1, se expresa en los núcleos de las células neoplásicas de modo heterogéneo es decir no en todas las células tumorales y en todas las células endoteliales. El transportador ABCC1 también se expresa en algunos núcleos de células neoplásicas en algunos núcleos de las rosetas de Flexner-Wintersteiner y Homer-Wright. El transportador ABCG2 se expresa en el citoplasma de algunas células neoplásicas, así como en células endoteliales de los vasos tumorales. En contraste con un estudio en 2006 (Wilson et al., 2006) se reportó una expresión del transportador ABCC1 en retinoblastoma, solamente en la membrana apical de las rosetas, en cambio la expresión de ABCB1 fue reportada en la membrana de células neoplásicas y por último ABCG2 mostró una tinción intensa en el citoplasma de las células tumorales y en el endotelio vascular igual que nuestros hallazgos.

Respecto a las frecuencias, en nuestro estudio, la proteína ABCB1 se expresó en 55 casos (30%) de los tumores, ABCC1 se expresó en 35 casos (19%) y ABCG2 se expresó 60 casos (33%). Por lo tanto, ABCG2 es el transportador más frecuentemente expresado en los tumores de este estudio. En el estudio de (Wilson et al., 2006) las frecuencias en sus 16 muestras corresponden para ABCB1 positivas en 8 casos (50%), ABCC1 2 casos (12%) y para ABCG2 no se encontró expresado en ninguno de los tumores estudiados. Siendo la proteína más frecuente ABCB1 a diferencia de ABCG2 que es la más frecuente en nuestra casuística. La discrepancia de los resultados, se podría atribuir al tamaño de la muestra, ya que nuestra (n) es más robusta con 181 casos en comparación al estudio realizado en 2006, incluye solo 16 casos.

Respecto a la asociación de datos clínicos y la expresión de estos transportadores, la única asociación que se encontró estadísticamente significativa ocurrió en casos bilaterales con respecto al transportador ABCB1 con la prueba razón de momios, obteniendo un valor de 2.46. Los resultados de esta prueba no se pueden comparar con otros estudios, porque no han realizado esta prueba.

Considerando que ciertas combinaciones de quimioterapia inducen la expresión de estos transportadores, revisamos los datos de tratamientos previos a

enucleación de los casos que expresaron los transportadores. Sin embargo, no encontramos relación alguna. Esto sugiere que la expresión de estas proteínas es heterogénea e inherente a la biología de cada tumor.

Por otro lado, es difícil determinar la contribución de estos marcadores a la resistencia a los medicamentos en ojos enucleados por retinoblastoma ya que se trata de tumores primarios, no de tumores metastásicos.

La observación de expresión de múltiples transportadores, sugieren la posibilidad de asociaciones con los rasgos clínicos de interés o con otros como el estadio oncológico o el tratamiento con quimioterapia previa a la enucleación. La revisión de estos datos arroja que de los 8 casos que expresan los tres transportadores, 4 son bilaterales y 4 son unilaterales, además que son 4 niños y 4 niñas. Los estadios oncológicos corresponden todos al estadio II y ninguno fue tratado con quimioterapia antes de la enucleación. De esto se puede sugerir que la expresión de ABCB1, ABCC1 y ABCG2 no es inducida por quimioterapia, ni están asociados a estadios oncológicos avanzados. Esto es consistente con las conclusiones de (Krishnakumar et al., 2004a), quienes han sugerido que la expresión de estas proteínas no se induce con la quimioterapia y apoya la postulación que la expresión de estos transportadores es heterogénea y corresponde a rasgos inherentes a la biología del tumor.

15. Conclusiones

- El transportador ABCB1 se asoció a casos bilaterales con un aumento en la probabilidad de 2.4 veces, sin embargo, no se correlaciona con el género.
- El transportador ABCG2, se expresó en el mayor número de casos y ABCC1 en el menor número de casos positivos.
- Ocho casos expresaron los tres transportadores y 33 casos expresaron dos transportadores sin ninguna correlación entre el estadio oncológico, género ni lateralidad de los pacientes.
- El transportador ABCG2 mostró la mayor intensidad en su expresión.

16. Perspectivas del trabajo

- Realización de estudios morfométricos para cuantificar el nivel de expresión de cada proteína con más precisión y considerar su asociación con los descriptores clínicos de este trabajo.
- Analizar la expresión de las proteínas ABC en retinoblastomas metastásicos
- Estos resultados indican que en casos metastásicos que expresen estos transportadores podría, considerarse como parte del tratamiento, inhibidores de los transportadores ABC como el verapamil

17. Referencias

- Abdullah, L. N., & Chow, E. K.-H. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-2-3>
- Allikmets, R., Schriml, L. M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., & Dean, M. (1998). A Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance1. *CANCER RESEARCH* (Vol. 58). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501111>
- Baguet, F., & Marechal, G. (1976). Bioluminescence of bathypelagic fish from the Strait of Messina. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology*, 53(2), 75–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5243>
- Brantley, M. A., Worley, L., & Harbour, J. W. (2002). Altered expression of Rb and p53 in uveal melanomas following plaque radiotherapy. *American Journal of Ophthalmology*, 133(2), 242–248. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812429>
- Callen, D. F., Baker, E., Simmers, R. N., Seshadri, R., & Roninson, I. B. (1987). Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Human Genetics*, 77(2), 142–144. <https://doi.org/10.1007/BF00272381>
- Chan, H. S., Thorner, P. S., Haddad, G., & Gallie, B. L. (1991). Multidrug-resistant phenotype in retinoblastoma correlates with P-glycoprotein expression. *Ophthalmology*, 98(9), 1425–1431. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(91\)32134-1](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(91)32134-1)

- Chintagumpala, M., Chevez-Barríos, P., Paysse, E. A., Plon, S. E., & Hurwitz, R. (2007). Retinoblastoma: review of current management. *The Oncologist*, 12(10), 1237–1246. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-10-1237>
- Christopher D.M Fletcher. (n.d.). DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO DE TUMORES | FLETCHER | Comprar libro 9789585913752. Retrieved March 1, 2019, from <https://www.casadellibro.com/libro-diagnostico-histopatologico-de-tumores/9789585913752/3044928>
- Cole, S. P., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M., & Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Research*, 54(22), 5902–5910. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7954421>
- Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11(7), 1156–1166. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>
- Del, M., Lagunas Cruz, C., Mendiola, A. V., & Soto Cruz, I. (2014). *ciclo celular: mecanismos de Regulación* (Vol. 17). Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2014/vre142e.pdf>
- Dimaras, H., Corson, T. W., Cobrinik, D., White, A., Zhao, J., Munier, F. L., ... Gallie, B. L. (2015). Retinoblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15021. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665–15670. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861027>
- El-Awady, R., Saleh, E., Hashim, A., Soliman, N., Dallah, A., Elrasheed, A., & Elakraa, G. (2017). The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 535. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00535>
- Fajardo-Gutiérrez. (2011). Registro de cáncer en niños. Retrieved April 3, 2019, from http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/rt/printerFriendly/1769/0
- Fletcher, O., Easton, D., Anderson, K., Gilham, C., Jay, M., & Peto, J. (2004). Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(5), 357–363. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996857>
- Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., & Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323(6089), 643–646. <https://doi.org/10.1038/323643a0>
- Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., & Sarkadi, B. (2004). The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Current Drug Delivery*, 1(1), 27–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305368>
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48–58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>
- Instituto Nacional de la Nutrición (Mexico), M., del Prado, M., & Salcedo, M. (2005).

- Revista de investigación clínica. Revista de investigación clínica* (Vol. 57). Instituto Nacional de la nutrición. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000400011
- Jo, D. H., Lee, K., Kim, J. H., Jun, H. O., Kim, Y., Cho, Y.-L., ... Kim, J. H. (2017). L1 increases adhesion-mediated proliferation and chemoresistance of retinoblastoma. *Oncotarget*, 8(9), 15441–15452. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14487>
- Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., & Ling, V. (n.d.). Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*, 316(6031), 820–823. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2412130>
- Kathawala, R. J., Gupta, P., Ashby, C. R., & Chen, Z.-S. (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates*, 18, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.11.002>
- Kleinerman, R. A., Schonfeld, S. J., & Tucker, M. A. (2012). *Sarcomas in hereditary retinoblastoma. Clinical Sarcoma Research* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1186/2045-3329-2-15>
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma, 68(4), 820–823. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC389051/pdf/pnas00079-0129.pdf>
- Krishnakumar, S., Mallikarjuna, K., Desai, N., Muthialu, A., Venkatesan, N., Sundaram, A., ... Shanmugam, M. P. (2004a). Multidrug resistant proteins: P-glycoprotein and lung resistance protein expression in retinoblastoma. *The British Journal of Ophthalmology*, 88(12), 1521–1526. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.047928>
- Krishnakumar, S., Mallikarjuna, K., Desai, N., Muthialu, A., Venkatesan, N., Sundaram, A., ... Shanmugam, M. P. (2004b). Multidrug resistant proteins: P-glycoprotein and lung resistance protein expression in retinoblastoma. *British Journal of Ophthalmology*, 88(12), 1521–1526. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.047928>
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. . (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology*, 167(1), 3–23. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00454-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00454-1)
- Linton, K. J. (2007a). Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*, 22(2), 122–130. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2006>
- Linton, K. J. (2007b). Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*, 22(2), 122–130. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2006>
- Lizzet, Y., Uicab, C., Beatriz, B., Canché, C., Ignacio, E., & Flores, I. (2010). *Review of characteristics of ABC transporters involved in fungal pathogenesis* (Vol. IV). Retrieved from http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v4n2/data/Revision_de_las_caracteristicas_de_los_transportadores_ABC_involucrados_en_patogenesis_fungica.pdf
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., ... Scott, M. P. (2016). *Biología celular y molecular*. Panamericana. Retrieved from

- <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/5505/Biologia-Celular-y-Molecular.html>
- Mantela, J., Jiang, Z., Ylikoski, J., Fritsch, B., Zacksenhaus, E., & Pirvola, U. (2005). The retinoblastoma gene pathway regulates the postmitotic state of hair cells of the mouse inner ear. *Development (Cambridge, England)*, 132(10), 2377–2388. <https://doi.org/10.1242/dev.01834>
- Miller, R. E., de Fremery, D., Bickoff, E. M., & Kohler, G. O. (n.d.). Soluble protein concentrate from alfalfa by low-temperature acid precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1177–1179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/436>
- Orjuela, M., Castaneda, V. P., Ridaura, C., Lecona, E., Leal, C., Abramson, D. H., ... Cordon-Cardo, C. (2000). Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(10), 4010–4016. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051250>
- Parulekar, M. V. (2010). Retinoblastoma — Current treatment and future direction. *Early Human Development*, 86(10), 619–625. <https://doi.org/10.1016/J.EARLHUMDEV.2010.08.022>
- Ramasubramanian, A., & Shields, C. L. (2012a). *Retinoblastoma*. Jaypee Brothers.
- Ramasubramanian, A., & Shields, C. L. (2012b). *Retinoblastoma*. Jaypee Brothers.
- Rd Kiss, S., Leiderman, Y. I., & Mukai, S. (n.d.). Diagnosis, Classification, and Treatment of Retinoblastoma. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.799.9734&rep=rep1&type=pdf>
- Riordan, J. R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., & Ling, V. (n.d.). Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, 316(6031), 817–819. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2863759>
- Rodriguez-Galindo, C., Orbach, D. B., & VanderVeen, D. (2015). Retinoblastoma. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), 201–223. <https://doi.org/10.1016/J.PCL.2014.09.014>
- Rodriguez-Galindo, C., & Wilson, M. W. (Eds.). (2010). *Retinoblastoma*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-89072-2>
- Rodriguez-Galindo, C., Wilson, M. W., Haik, B. G., Merchant, T. E., Billups, C. A., Shah, N., ... Pratt, C. B. (2003). Treatment of intraocular retinoblastoma with vincristine and carboplatin. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(10), 2019–2025. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.09.103>
- Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., ... Pastan, I. (1986). Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4538–4542. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.12.4538>
- Sánchez-Suárez, P., Luis Benítez-Bribiesca, Y., Benítez Bribiesca, L., & Sánchez Suárez, P. (2006). *Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. Cancerología* (Vol. 1). Retrieved from [46](http://incan-</p></div><div data-bbox=)

- mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1172289440.pdf
- Shen, D. W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1986). Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4750), 643–645. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3457471>
- Shields, J. A., Shields, C. L., & Parsons, H. M. (1991). Differential diagnosis of retinoblastoma. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 11(2), 232–243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1925090>
- Shukalek, C. B., Swanlund, D. P., Rousseau, R. K., Weigl, K. E., Marensi, V., Cole, S. P. C., & Leslie, E. M. (2016). Arsenic Trigluthathione [As(GS) 3] Transport by Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1) Is Selectively Modified by Phosphorylation of Tyr920/Ser921 and Glycosylation of Asn19/Asn23 s. *MOLECULAR PHARMACOLOGY Mol Pharmacol*, 90, 127–139. <https://doi.org/10.1124/mol.116.103648>
- Shukla, S., Srivastava, A., Kumar, S., Singh, U., Goswami, S., Chawla, B., ... Kaur, J. (2017). Expression of multidrug resistance proteins in retinoblastoma. *International Journal of Ophthalmology*, 10(11), 1655–1661. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.11.04>
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., & Remião, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*, 149, 1–123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica., A. I. Á. DE, & DUARTE, M. M. P. (2008). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* (Vol. 7). Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611255003>
- Suárez, Y., Adams, H. E., & McCutcheon, B. A. (1976). Flooding and systematic desensitization: efficacy in subclinical phobias as a function of arousal. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 44(5), 872. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9429>
- Tolentino, F. I., & Tablante, R. T. (1972). Cryotherapy of Retinoblastoma. *Archives of Ophthalmology*, 87(1), 52–55. <https://doi.org/10.1001/archopht.1972.01000020054011>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281–290. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
- Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Reports*, 7, 14. <https://doi.org/10.12703/P7-14>
- Wilson, M. W., Fraga, C. H., Fuller, C. E., Rodriguez-Galindo, C., Mancini, J., Hagedorn, N., ... Stewart, C. F. (2006). Immunohistochemical Detection of Multidrug-Resistant Protein Expression in Retinoblastoma Treated by Primary Enucleation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(4), 1269. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1321>
- Zheng, H.-C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>

