



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Secretaría de Investigación y Posgrado

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación
“Programa de Maestría en Ciencias
Quimicobiológicas”

**EVALUACIÓN DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN MULTI-
RESISTENCIA A FÁRMACOS (*MDR1*) POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN YIN-
YANG 1 (YY1) EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA
BIOL. GABRIELA ANTONIO ANDRÉS

DIRECTORA INTERNA: DRA RUTH ANGÉLICA LEZAMA PALACIOS
DIRECTORA EXTERNA: DRA SARA HUERTA YEPEZ

MÉXICO DF. MARZO 2012





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 16:00 horas del día 7 del mes de marzo del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Evaluación de la regulación transcripcional del gen de multi-resistencia a fármacos (MDR1) por el factor de transcripción Yin-Yang 1 (YY1) en la Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil

Presentada por el alumno:

Antonio
Apellido paterno

Andrés
Apellido materno

Gabriela
Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	2	2	1
---	---	---	---	---	---	---

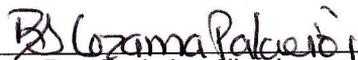
aspirante de:

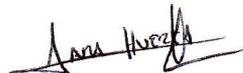
Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios


Dra. Sara Huerta Yépez


Dra. Elba Reyes Maldonado


Dra. María Lilia Domínguez López


Dra. Lucía Quevedo Corona


Dra. María del Rocío Elizabeth Ortiz Butrón

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Manuel Jesús Piñón López





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

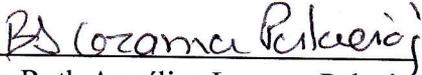
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 29 del mes Agosto del año 2011, el (la) que suscribe la Bióloga Gabriela Antonio-Andrés alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro A100221, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra Ruth Angélica Lezama Palacios y Dra Sara Huerta Yopez y ceden los derechos del trabajo intitulado “Evaluación de la regulación transcripcional del gen multi-resistencia a fármacos (MDR1) por el factor de transcripción Yin-Yang 1 (YY1) en la leucemia linfoblástica aguda infantil”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

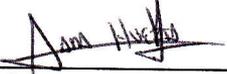
Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección shuertay@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Bióloga Gabriela Antonio-Andrés
Nombre y firma del alumno



Dra Ruth Angélica Lezama Palacios
Nombre y firma del (los) director (es)



Dra Sara Huerta Yopez
Nombre y firma del (los) director (es)

Tutora Interna

Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios

Tutora Externa

Dra. Sara Huerta Yopez

Comité tutorial:

Dra. Elba Reyes Maldonado

Dra. María Lilia Domínguez López

Dra. Lucía Quevedo Corona

Dra. Rocío Ortiz Buitrón



El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la dirección de la Dra. Sara Huerta Yezpez.

Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación y ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo el número de proyecto (HIM/2009/029) y contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro CONACYT 2007/C01/69789. Se reconoce al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado a la sustentante durante la realización de esta tesis de maestría a través de la beca número 350130.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
1. RESUMEN	2
1.1 Abstract	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Cáncer Infantil	4
2.2 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	6
2.2.1 Patogénesis	7
2.2.2 Clasificación de LLA	7
2.2.3 Diagnóstico	9
2.2.4 Tratamiento	10
2.2.5 Clasificación de riesgo de pacientes con LLA	11
2.3 Quimiorresistencia en la LLA	12
2.4 Proteína MDR1	13
2.5 Factor de transcripción Ying-Yang1 (YY1)	16
3. JUSTIFICACIÓN.	18
4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVO GENERAL	20
6.1 Objetivos específicos	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Ensayos de plásmidos reporteros	21
7.2 Inmunoprecipitación de cromatina (ChiP)	24
7.3 Pacientes	26
7.4 Purificación de células de sangre periférica	26
7.5 Preparación de laminillas	27
7.6 Inmunocitoquímica	27
7.7 Cuantificación de células positivas inmunoteñidas	28
7.8 Cuantificación de intensidad de expresión en células inmunoteñidas	28
7.9 Análisis estadístico	28
8. RESULTADOS	29
8.1 Interacción de YY1 con la región promotora del gen de <i>mdr1</i>	29
8.2 Análisis Clínico	32

8.3 Evaluación de la expresión de YY1 y MDR1.	34
8.4 Expresión de YY1 y MDR1 después de la diferentes etapas de tratamiento	40
8.5 Asociación de la expresión de YY1 y MDR1 y el pronóstico en pacientes con LLA	48
10. DISCUSION	58
11. CONCLUSIONES	63
12. REFERENCIAS	64

ABREVIATURAS

ABC	Familia de proteínas casete de unión adenosin trifosfato (ATP)
AI	Alta intensidad
BI	Baja intensidad
CMN	Células Mononucleares
ChiP	Inmunoprecipitación de la cromatina
DAB	Diamino-bencidina
DR5	Receptor de muerte 5
FAB	Grupo Franco-Americano-Británica
Fas	CD95 (FAS/APO-1) Antígeno de apoptosis
FOXO3	Factor de transcripción Forkhead 3
Gp-170	Glicoproteína 170
HIF-1	Factor inducible por hipoxia-1
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
IgG	Inmunoglobulina G
I-Remisión	Inducción a la Remisión
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda Fenotipo B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda Fenotipo T
Luc	Luciferasa
<i>mdr1</i>	Gen que codifica la proteína de multirresistencia a drogas
MDR1	Proteína de Multirresistencia a Drogas 1
MI	Mediana intensidad
miR 138	Micro RNA 138
MO	Medula ósea
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
TESS	Sistema de Búsqueda de Elementos de Transcripción
SFB	Suero fetal de bovino
SP	Sangre periférica
STAT3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3,
URL	Unidades relativas de luciferasa
YB-1	Proteína de unión Y-box 1
YY1	Ying Yang 1

1. RESUMEN

Introducción. En nuestro país la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la primera causa de cáncer infantil, alrededor del 30% de los pacientes no responden a los tratamientos convencionales y no sobreviven. Uno de los mecanismos más estudiados es la resistencia mediada por la proteína de multiresistencia a drogas 1 (MDR1). Previamente determinamos que el promotor del gen de *mdr1* posee 4 sitios de unión para el factor de transcripción Ying Yang 1 (YY1), se ha demostrado que su sobre-activación en células tumorales representa un mecanismo de resistencia a la apoptosis, lo cual sugiere que pudiera estar participando en la regulación transcripcional de *mdr1*.

Objetivo. Evaluar la regulación transcripcional del gen de *mdr1* por el factor de transcripción YY1, su expresión en las diferentes etapas de quimioterapia y su correlación con los factores pronóstico de respuesta al tratamiento en la LLA.

Métodos. Se clonó la región promotora del gen de *mdr1*, en el plásmido reportero PGL3, se mutaron cada uno de los sitios de unión para YY1, y se transfectaron a la línea celular PC3 para evaluar la actividad de la luciferasa como gen reportero. Se realizó Chip en la línea celular RS4;11 utilizando un anticuerpo específico para YY1, y se evaluó su unión para cada uno de los sitios, mediante la amplificación por PCR de los segmentos inmunoprecipitados. Por otro lado, se determinó la expresión por inmunocitoquímica de MDR1 y YY1 en células mononucleares de sangre periférica de 88 pacientes pediátricos con LLA y 53 individuos controles. Se cuantificó el porcentaje de células positivas y la intensidad de expresión de ambas proteínas al diagnóstico, y al término de las diferentes etapas del tratamiento, y se evaluó su correlación con los factores de riesgo que determinan la posible respuesta al tratamiento quimioterapéutico.

Resultados. La actividad del promotor de *mdr1* muestra una disminución significativa del gen reportero, en las 4 mutaciones de los sitios YY1, mediante el Chip se demostraron que YY1 se une a los cuatro sitios de la región promotora. Se encontró que la expresión de YY1 y MDR1 esta aumentada en las células mononucleares de pacientes con LLA en comparación con los individuos controles y esta expresión es directamente proporcional. Por otro lado, se determino que los pacientes con subtipo L1 (subtipo morfológico menos agresivo) se presenta una expresión menor en comparación con los pacientes con LLA L2. También se observo mayor expresión de ambas proteínas en pacientes del género masculino.

Conclusiones. Se demuestra por primera vez que YY1 regula de manera transcripcional al gen *mdr1*. Esto correlaciona con el aumento en la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con LLA en comparación con individuos control y esta expresión se ve aumentada después de la quimioterapia. Una mayor expresión correlaciona de manera directa con algunos factores de riesgo de mala respuesta al tratamiento, como son subtipo morfológico y género.

1.1 Abstract

Introduction. In our country, acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the leading cause of childhood cancer, about 30% of patients do not respond to conventional treatments and do not survive. One of the most studied mechanisms is mediated resistance protein multiple drugs resistance 1 (MDR1). Previously we determined that the *mdr1* gene promoter has 4 binding sites for transcription factor Ying Yang 1 (YY1), has shown that its over-activation in tumor cells provides a mechanism of resistance to apoptosis, This suggests that might be involved in the transcriptional regulation of *mdr1*.

Objective. Assess the transcriptional regulation of the *mdr1* gene by transcription factor YY1, expression at different stages of chemotherapy and their correlation with prognostic factors of treatment response in ALL.

Methods. Promoter region was cloned gene *mdr1*, in the reporter plasmid PGL3, were mutated each of the binding sites for YY1, and transfected cell line PC3 to evaluate the activity of the luciferase reporter gene. Chip was performed in the cell line RS4;11 using an antibody specific for YY1, and assessed for binding to each of the sites, by PCR amplification of the segments immunoprecipitates. Was determined by immunocytochemistry the expression of MDR1 and YY1 in peripheral blood mononuclear cells of 88 pediatric ALL patients and 53 control subjects. We quantified the percentage of positive cells and intensity of expression of both proteins in the diagnosis, and end of the different stages of treatment, and evaluated their correlation with risk factors that determine the potential response to chemotherapy.

Results. The *mdr1* promoter activity shows a significant decrease of the reporter gene, 4 mutations in the YY1 sites, Chip through YY1 demonstrated that joins the four sites in the promoter region. It was found that expression of YY1 and MDR1 is increased in mononuclear cells from patients with ALL compared to normal subjects and this expression is directly proportional. On the other hand, it was determined that patients with L1 subtype (morphologic subtype less aggressive) presents a lower expression compared with patients with ALL L2. Also observed increased expression of both proteins in male patients.

Conclusions. Is demonstrated for the first time adjusted so that YY1 transcriptional the *mdr1* gene. This correlates with the increased expression of YY1 and MDR1 in ALL patients compared to control subjects and this expression is increased after chemotherapy. Increased expression correlates directly with risk factors of poor response to treatment, such as morphologic subtype and gender.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer Infantil

En la actualidad el cáncer representa la segunda causa de muerte en el mundo en menores de 15 años, solo antecedida por los accidentes; la Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones¹. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común en niños y representa 23% de los cánceres en menores de 15 años a nivel mundial, en una tasa anual aproximada de 30 a 40 casos por millón. Anualmente, la LLA se diagnostica en aproximadamente 2.900 niños y adolescentes menores de 20 años en los Estados Unidos, y ha observado en aumento gradual en la incidencia de esta enfermedad en los últimos 25 años. La incidencia de LLA en niños de 2 a 3 años de edad es aproximadamente cuatro veces mayor que en lactantes y casi 10 veces mayor que en adolescentes de 16 a 21 años².

En México el panorama no es diferente, los datos reportados por el INEGI para el 2009 muestran que la leucemia es la segunda causa de mortalidad en la población de 5 a 14 años ocupando el 8.7 % del total de las defunciones, solo antecedida por los accidentes con una tasa de 2.7 por cada 100, 000 habitantes³Tabla1.

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en edad escolar

Causas de mortalidad en preescolares de 5 a 14 años, 2009.				
Orden	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	Total	6565		100.0
1	Accidentes de tráfico por vehículo de motor	878	4.1	13.4
2	Leucemia	574	2.7	8.7
3	Ahogamiento y sumersión accidentales	317	1.5	4.8
4	Lesiones autoinflingidas intencionalmente (suicidios)	191	0.9	2.9
5	Agresiones (homicidios)	189	0.9	2.9
6	Otras causas	1352	0.1-0.9	0.5-2.8

1/ Tasa por 100,000 habitantes

Fuente: Elaborado a partir de la base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud.⁴

Aunque no existen datos epidemiológicos recientes sobre las neoplasias infantiles en nuestro país, los reportes que nos muestran un panorama de cómo se encuentran estas patologías en los últimos años. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) en conjunto

con el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), comparado con un estudio realizado por otras instituciones de salud en México incluyendo el IMSS, durante el periodo de 15 años (1980 a 1995) apoya el hecho de que las leucemias representan la neoplasia más frecuentes en edad pediátrica con el 34.4% de los casos; en comparación con Estados Unidos en donde las leucemias representan el 30% (Tabla 2)⁵.

Tabla 2. Frecuencias de neoplasia en pacientes pediátricos

Diagnóstico	INP (%)	HIMFG (%)	Estudio multicéntrico en México (%)
Leucemia	35	40.9	34.4
Linfoma	16	12.4	19.5
Retinoblastoma	12	5	8.5
Tumores de sistema nervioso central	10	14	10
Tumores óseos	6	5.3	6.5
Tumores renales	5	4.8	5.6
Tumores de células germinales	3	3.8	5.1
Histiocitosis	3	3.6	1.5
Sarcomas	3	3.7	4.8
Neuroblastoma	2	1.9	2.7
Otros	5	2.7	1.4

Fuente: Medina-Sanson A. 2002⁵.

El reporte publicado más recientemente sobre la incidencia de la leucemia en nuestro país, de específicamente en la ciudad de México, analiza los casos registrados en diferentes hospitales de esta ciudad en los años 2006 a 2007, mostrando nuevamente que la LLA es el tipo más frecuente de leucemia, constituyendo el 85.1 % de los casos, presentándose en niños con edades de 1 a 4 años⁶. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, la epidemiología es similar a la descrita en la literatura, aunque no existan reportes específicos para esta institución de salud, la experiencia clínica indica que se reciben más de 80 pacientes por año con diagnóstico de esta enfermedad⁷.

2.2 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

La LLA es una neoplasia maligna caracterizada por una alteración citogenética que ocasiona la proliferación monoclonal anormal de células precursoras de la serie linfoide y que infiltra más del 25% de la médula ósea⁸.

Una serie de eventos mutagénicos determinan la pérdida de los mecanismos que regulan la división y diferenciación celular, ocasionando la expansión monoclonal de una célula precursora de la serie linfoide. Comprende un grupo de neoplasias linfoides que se asemejan morfológicamente e inmunofenotípicamente al linaje B y T, y tienen una amplia participación de la médula ósea y sangre periférica. La clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud de las neoplasias hematopoyéticas designa a estos trastornos como leucemia linfoblástica de estirpe B o T, aproximadamente el 85% de los casos es del linaje B⁸.

Normalmente en la médula ósea sana los leucocitos constituyen el 5% o menos, sin embargo, en la LLA hay aumento de los estadios inmaduros constituyendo entre el 30 y el 100 % de la celularidad de la médula ósea. El aumento de esta celularidad en la médula ósea, inhibe la producción de células hematopoyéticas normales como eritrocitos, plaquetas y leucocitos. Esto origina que salgan de la médula ósea hacia la circulación sanguínea, al sistema linfático e invadir cerebro y el sistema nervioso central (SNC)⁹.

Los síntomas y signos que se presentan en esta enfermedad se correlacionan con la carga de células leucémicas y el grado de sustitución de la médula ósea, que lleva a citopenias. Los síntomas más comunes son fiebre (causada por leucemia, una infección agregada o neutropenia), fatiga y letargo (como consecuencia de la anemia), dolor óseo y articular, diátesis hemorrágica (en relación con trombocitopenia). Los pacientes con LLA de precursores de células T / B a menudo se presentan con masa mediastinal, con o sin derrame pleural, que puede conducir a otras patologías. Pueden mostrar lesiones en la piel, adenopatías en la cabeza y el cuello o lesiones aisladas del hueso. Las anomalías hematológicas más comunes en la LLA incluyen anemia, trombocitopenia, neutropenia, leucopenia o hiperleucocitosis ($>100 \times 10^9/L$) presentes en aproximadamente el 15% de los pacientes pediátricos. Otras anomalías comunes son los niveles elevados de ácido úrico en suero y de lactato deshidrogenasa, que se correlaciona con la carga tumoral⁸.

2.2.1 Patogénesis

Biológicamente, la LLA se caracteriza por una acumulación no controlada de células progenitoras hematopoyéticas con bloqueo en su programa de diferenciación. La investigación intensiva en las últimas dos décadas ha evidenciado de manera importante, que la LLA es el producto de varios procesos asociados con la adquisición de múltiples cambios genéticos. Se ha descrito que este cambio puede ser ocasionado por agentes carcinogénicos, como químicos, infecciones virales, radiación, luz solar, etc. Por otro lado, se ha determinado que algunos factores ambientales pueden influir en la aparición de la LLA. Se sabe que la exposición a dosis altas o repetidas de radiación ionizante, la cual incluye rayos X y rayos gamma, aumentan las posibilidades de desarrollar esta enfermedad. También, la radiación utilizada en el tratamiento en diversos tipos de cánceres puede determinar su aparición. No todas las células son igualmente susceptibles a estos agentes, pero una alteración genética o el efecto de algún otro agente, puede aumentar la posibilidad en las células para convertirse en cancerosas. Dentro de las lesiones genéticas más comunes en la LLA es la translocación 12; 21 (t (12;21)). Esta translocación también se conoce como fusión TEL-AML1 y ocurre en aproximadamente el 20% de los pacientes con LLA. Alrededor del 5% de niños con LLA tienen la translocación t (9; 22) o cromosoma Philadelphia (Ph). Otra translocación cromosómica importante es t (4;11) relacionado con el gen MLL^{9,10}.

Ciertos trastornos hereditarios pueden aumentar el riesgo de leucemias. Por ejemplo, los niños con síndrome de Down tienen un riesgo 20 veces mayor de desarrollar esta enfermedad y que su desarrollo sea desfavorable. Otros trastornos genéticos poco comunes asociados con un mayor riesgo incluyen el síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia, neurofibromatosis, síndrome de Schwachman A, y agammaglobulinemia congénita ligada al cromosoma X^{9,11}.

2.2.2 Clasificación de LLA

El estudio de diversas características detectables en las células leucémicas ha permitido la clasificación de esta neoplasia desde los puntos de vista morfológico, inmunológico y citogenético⁸.

1) Clasificación morfológica

Esta clasificación ha sido bien detallada en la literatura y se puede resumir en las categorías descritas por la clasificación del Grupo Franco-Americano-Británico (FAB), la cual se basó principalmente en características morfológicas que presentan las células leucémicas y se dividen en tres grupos designados como L1, L2 y L3, que se describen en la tabla 3 ¹².

Tabla 3. Clasificación Morfológica de LLA.

Características histológicas	L1	L2	L3
Tamaño celular	Predominio de células pequeñas	Muchas células grandes. Heterogéneas.	Muchas células grandes. Homogéneas.
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable, con frecuencia más o menos abundante.	Moderadamente abundante
Nucléolos	Visibles, o no llamativos	Uno o más, grandes	Uno o más, prominentes
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable, heterogénea en cada caso.	Finamente punteada, homogénea.
Forma nuclear	Regular, pueden estar hendidos o indentados.	Irregular, hendidos o indentados.	Regular, ovalados y también redondos
Basofilia citoplasmática	Variable	Variable	Intensa
Vacuolización citoplasmática	Variable	Variable	Prominente

Fuente Grupo Franco-Americano-Británico (FAB), 1976 ¹².

2) Clasificación inmunofenotípica

Los estudios inmunofenotípicos son un componente esencial en la rutina diagnóstica de la LLA, se divide en precursor de células B (LLA-B) y en precursores de células T (LLA-T) ⁸.

La LLA-B se caracteriza por la expresión de una variedad de antígenos específicos de células B, que incluyen, CD19, CD20, CD22 (marcadores de superficie y de citoplasma), CD24, y CD79a (citoplasmática). Una gran proporción de LLA-B también expresan CD10 (antígeno común de leucemia linfoblástica aguda), el cual es un antígeno que constantemente es expresado en las células B progenitoras, otros antígenos a menudo expresados por los blastos leucémicos, incluyen marcadores progenitores de las primeras etapas de células B precursoras,

incluyendo CD34 y desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT). La LLA de precursores B, representan del 80% al 85% de la LLA infantil. La LLA-T, se caracteriza por la expresión de antígenos asociados al linaje T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8), así como CD1a, CD10, CD34, CD99, HLA-DR y Tdt. Con frecuencia pueden expresar antígenos mieloides como el CD11b, CD13, CD15, CD33 y en raras ocasiones CD117. A menudo este inmunofenotipo se correlaciona con una mala respuesta al tratamiento en la LLA.^{8,13}.

3) Clasificación citogenética

El análisis citogenético estándar es una herramienta esencial en el manejo de todo paciente con LLA porque el cariotipo de las células leucémicas tiene una implicación importante en su diagnóstico, tratamiento y pronóstico. Las alteraciones genéticas clínicamente importantes de células precursoras B incluyen las translocaciones cromosómicas y una variedad de reordenamientos del gen MLL e hiperdiploidía. Las principales alteraciones se muestran en la tabla 4¹⁴.

Tabla 4. Translocaciones cromosómicas más frecuentes en LLA.

Translocación	Frecuencia	Genes Afectados	Características
t(1:19)(q23;p13)	5-6%	E2A-PBX1	Fenotipo pre-B con Hiperleucocitosis Mal pronóstico, necesario tratamiento intensivo.
t(9:22)(q34;p11)	3-5%	BCR-ABL	Cromosoma Philadelphia. Hiperleucocitosis Mal pronóstico.
t(4:11)(q21;p23)	2%	MLL-AF4	Estirpe B, asociado a LLA lactante. Hiperleucocitosis Mal pronóstico.
t(12:21)(p13;q22)	25% de LLA pre-B	TEL-AML	Fenotipo B. Buen pronóstico.

Fuente Lassaletta Atienza A. 2004¹⁴

2.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico correcto es esencial para la clasificación de este grupo heterogéneo de enfermedades, además juega un papel central para la clasificación del paciente y el tratamiento

quimioterapéutico. La evaluación inicial se obtiene a partir de un recuento de leucocitos totales y cuenta diferencial en un frotis de sangre periférica, para determinar la presencia y morfología de los linfoblastos. Un elevado conteo de leucocitos de $10 \times 10^9/L$ se presenta en aproximadamente la mitad de los pacientes con LLA. El número de los blastos al momento del diagnóstico, continúa siendo el indicador más importante en el pronóstico del paciente. La neutropenia, anemia y trombocitopenia pueden presentarse debido a la inhibición de la hematopoyesis normal ^{8,14}.

El diagnóstico definitivo de una leucemia, se debe realizar mediante el análisis morfológico, molecular y citogenético del aspirado de la médula ósea (MO). La presencia de al menos el 25% de blastos en la MO confirmará el diagnóstico. El subtipo de LLA se definirá con los estudios morfológicos. Se debe realizar un examen del líquido cefalorraquídeo, para descartar la afectación inicial del SNC. Una radiografía de tórax inicial permite conocer la existencia de una masa mediastinal, bioquímica sanguínea, estudio de coagulación, serologías e inmunoglobulina ¹⁴.

2.2.4 Tratamiento

El manejo óptimo de los pacientes con LLA, incluye un tratamiento inmediato y la prevención de complicaciones metabólicas o infecciosas. El tratamiento quimioterapéutico consiste en tres fases ¹⁵:

A) Inducción de la remisión. En esta fase se pretende eliminar la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se prescriben medicamentos como vincristina, prednisona y L-asparginasa, el grado de remisión actual bajo este régimen es de 70 a 90%. Los tratamientos de inducción a la remisión son cada vez más agresivos, pero mejora la supervivencia de los pacientes. Si en esta fase se administran dexametasona o metilprednisolona en esquemas cortos de cuatro días, se logra inducir la diferenciación de blastos mieloides y la aparición de progenitores hematopoyéticos CD34, con reducción de leucopenia inducida por la quimioterapia ^{13,15}.

B) Tratamiento de consolidación o post-remisión. Con la recuperación de la hematopoyesis se inicia el tratamiento de consolidación, que debe iniciarse inmediatamente después de la fase de remisión. En esta fase el objetivo es eliminar las células residuales que han sobrevivido en la etapa previa; se administran dosis altas de metotrexato, con o sin 6-mercaptopurina, L-

asparginasa y citarabina, o bien, combinación de dexametasona, vincristina, L-asparginasa, doxorubicina y tioguanina, con o sin ciclofosfamida ¹³.

C) Tratamiento de mantenimiento. Conocido como mantenimiento o continuación de la remisión, tiene como objetivo eliminar las células residuales leucémicas. Se administran fármacos como mercaptopurina y metotrexato. Estos fármacos son tolerados adecuadamente y se administran durante dos o tres años. La recaída de la enfermedad con o sin afección extramedular, se interpreta como mal pronóstico para los pacientes. Otros factores que indican mal pronóstico son falla al tratamiento, remisión inicial parcial, aparición de blastos circulantes y leucocitosis ¹³.

2.2.5 Clasificación de riesgo en pacientes con LLA

La supervivencia en los niños con LLA ha tenido un gran avance debido al mejor entendimiento de su fisiopatología, al desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos y a la mejoría de los cuidados de soporte de los pacientes. Actualmente, la tasa de supervivencia para los pacientes con LLA ha aumentado de manera importante, esto se debe en gran medida al uso de terapia adaptada al riesgo, lo cual implica la intensidad del tratamiento al paciente. Este enfoque fue desarrollado después de la constatación de que la LLA pediátrica es una enfermedad heterogénea que difiere marcadamente en su respuesta a la quimioterapia. Al adaptar la intensidad del tratamiento con base al riesgo relativo de recaída, se disminuye la posibilidad de tratar al paciente de manera deficiente o excesiva y así mejora la probabilidad de curación. Aunque la asignación de riesgo es influenciada por una serie de parámetros clínicos y de laboratorio, las alteraciones genéticas que están vinculadas a la patogénesis de diferentes subtipos de leucemia, son los parámetros más importantes durante la clasificación ^{15,16}.

Desafortunadamente, la asignación precisa del riesgo es un proceso difícil y costoso, que requiere estudios intensivos de laboratorio, incluyendo el inmunofenotipo, citogenética y diagnóstico molecular. Por otra lado, estos métodos de diagnóstico requieren la experiencia colectiva de un número de profesionales, y aunque esta experiencia está disponible en los centros médicos más importantes, por lo general no están disponibles en los países en vías de desarrollo, por lo que los criterios clínicos y de laboratorio son de gran importancia para determinar el riesgo de un paciente y clasificarlo dentro de los dos principales grupos (Bajo riesgo o riesgo estándar y alto riesgo). Dentro de los criterios que se han utilizado para estratificar a los pacientes se encuentran: a) la edad, considerándose a niños mayores a 10 años y menores de un año como de alto riesgo, b) género, el género masculino presenta mayor riesgo que el género femenino, esto se debe en parte a los episodios de recaídas

testiculares. c) factores citogenéticos, es más probable que los pacientes se curen si sus células leucémicas tienen un mayor número de cromosomas (hiperdiploides), especialmente si hay un cromosoma 4, 10, y 18 adicional. Los niños cuyas células leucémicas tienen menos cromosomas (hipodiploides) tienen menor probabilidad de curarse. Las translocaciones entre los cromosomas 12 y 21, así como en los cromosomas 9 y 22, 4 y 11, presentan menor probabilidad de curación. d) cuenta de leucocitos, generalmente se utiliza un conteo de 50,000 células por mm³ como límite para clasificar al paciente entre un mejor o peor pronóstico. Además, otro factor que se considera desfavorable es presentar inmunofenotipo T, este es el criterio más importante ^{15,16}.

2.3 Quimiorresistencia en la LLA

El uso de quimioterapia para tratar al cáncer está limitado por el desarrollo de células cancerosas resistentes a los diversos esquemas de tratamiento, aún cuando estos han mostrado tener éxito, de un 20 a 30% de los pacientes con LLA presenta quimiorresistencia. La resistencia puede ocurrir a fármacos citotóxicos con diferente estructura química y mecanismos de acción. Se han estudiado extensamente los mecanismos de resistencia, los cuales incluyen alteraciones en el control del ciclo celular, en los mecanismos de apoptosis o de reparación en el daño celular, y la reducción de acumulación de los fármacos, esta última ha sido estudiada más en detalle, y parece ser un mecanismo muy común en el fracaso de las terapias anticancerígenas ^{17,18}.

El mecanismo de reducción de la acumulación de drogas más estudiado, es el ejercido por la proteína de multiresistencia a drogas 1 (MDR1) codificada por el gen *mdr1*, este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 y codifica una proteína de 170 KD (p 170), también conocida como glicoproteína p (gP-170). Este gen forma parte de una pequeña familia que tiene 2 miembros en los humanos (*mdr1 mdr2/3*). La familia MDR pertenece a la superfamilia de proteínas ABC (adenosine triphosphate (ATP)- binding cassette) especializadas en el transporte membranal dependiente de energía, que participan en un amplio rango de eventos como la expulsión de sustancias nocivas, secreción de toxinas y movilización de iones y péptidos. Varios estudios realizados han demostrado que el gen *mdr1* induce resistencia a la quimioterapia en diversos tipos de cáncer como mama, próstata, colon, leucemia mieloblástica y LLA ^{18,19}.

2.4 Proteína MDR1

La proteína MDR1 está compuesta por una cadena de aproximadamente 1, 280 residuos de aminoácidos con 2 mitades homólogas y 12 dominios transmembrana. Presenta 2 sitios de unión al ATP ubicados en la parte citoplasmática, un sitio de glicosilación entre el primero y el segundo dominio transmembrana y varios sitios de fosforilación (Figura 1) ^{20,21}.

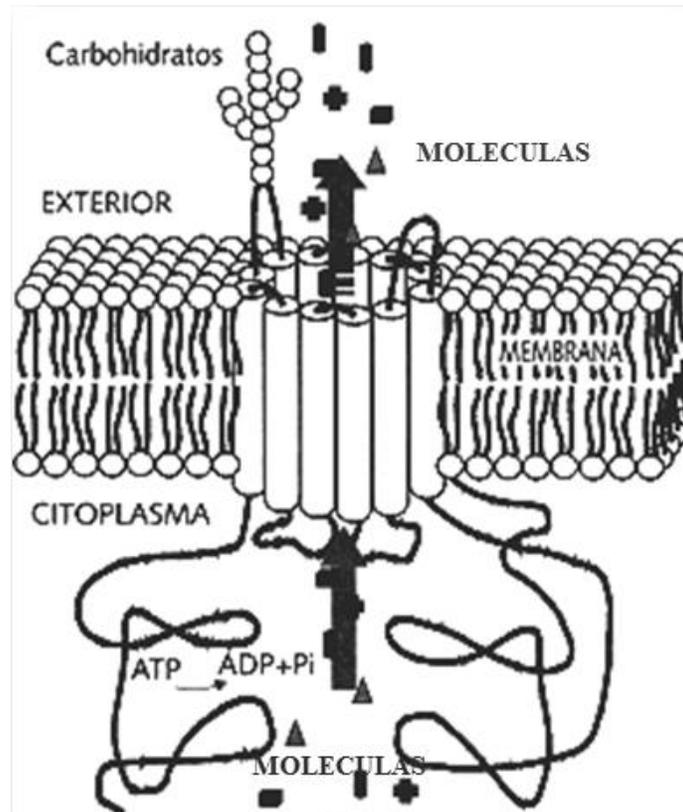


Figura 1. Estructura tridimensional de la glicoproteína-P (MDR1). Esta molécula presenta una dominio formada por doce subunidades ancladas a la membrana. En el centro de esta porción se sitúa un canal por donde se expulsan las drogas. Además, presenta un dominio intracelular donde radica la actividad ATPasa y una cadena extracelular de carbohidratos ²¹.

La proteína MDR1 actúa como una bomba expulsora por un mecanismo no conocido totalmente. Se especula que las drogas pasan a través de un poro hidrofóbico formado por un dominio transmembrana y que la salida de sustancias requiere de un cambio conformacional de la proteína dependiente de energía. Se ha sugerido que el estado de fosforilación de MDR1 pudiera regular este proceso y modular la resistencia a citotóxicos. Una segunda hipótesis de cómo MDR1 logra disminuir la concentración intracelular de las drogas, postula que lo hace de forma indirecta, por regulación de gradientes de pH y/o eléctrico en la membrana plasmática

(Figura 2). MDR1 constituye un sistema de detoxificación natural que se expresa en varios tejidos humanos normales, asociados con funciones secretoras o de barrera. Se ha desarrollado en canalículos biliares, conductos pancreáticos, intestino delgado y grueso, túbulo proximal de la nefrona, glándula adrenal, placenta y en las células endoteliales del sistema nervioso central y del testículo, pudiendo estar implicada en los supuestos santuarios de algunos procesos malignos como la LLA. La mayoría de los posibles sustratos de MDR1 son productos naturales e incluyen alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina); antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina e idarrubicina); epipodófiloxinas (etopósido y tenipósido) y taxanos (paclitaxel y taxotere), entre otras drogas ^{17,20,21}.

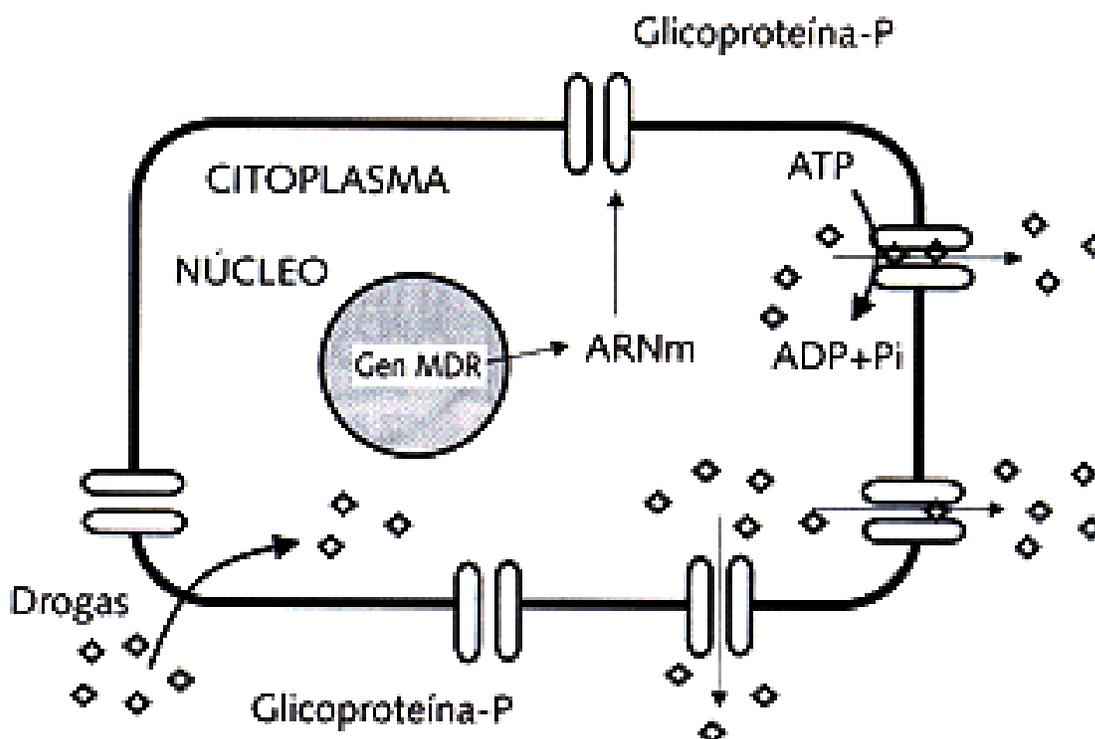


Figura 2. Resistencia mediada por glicoproteína-P (MDR1). La proteína sintetizada se coloca en la membrana plasmática. Las drogas que entran en la célula son expulsadas al exterior a través del poro que forma esta molécula. El proceso se realiza mediante la energía liberada de la hidrólisis del ATP ²¹.

En los últimos años las investigaciones que se han realizado en torno a MDR1 están dirigidas a determinar los factores que influyen en la regulación transcripcional de esta proteína en los diversos tipos de cáncer. Se sabe que el factor de transcripción YB-1 está implicado en la regulación de la expresión de MDR1 en cáncer de mama y osteosarcoma, así como su vinculación con la resistencia al tratamiento con paclitaxel ²². Por otro lado, se ha demostrado que el factor de transcripción FOXO3a interactúa con los elementos iniciadores de la

transcripción de MDR1 que actúa como un sensor y regulador de esta proteína, causada por el estrés citotóxico en respuesta a la acción de la doxorubicina, promoviendo la supervivencia de células de leucemia mieloide ²³.

Recientemente, se evaluó el papel de MDR1 en la apoptosis en una línea celular de LLA, se encontró que existe una correlación significativa entre la expresión de esta proteína y la fosforilación de Akt, lo cual induce apoptosis mediada por TRAIL, mientras la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt puede revertir la resistencia mediada por MDR1, pues la unión de DR5 con TRAIL induce la actividad de caspasa-3, que es responsable de la degradación de MDR1 de llevar a apoptosis ²⁴.

Por otro lado, recientemente se ha reportado que el micro RNA 138 (miR 138) regula la resistencia a la acción de la vincristina mediada por la actividad de MDR1 en una línea celular de leucemia mieloide (HL-60), miR 138 participa de manera importante en la regulación de este gen ²⁵. Así mismo, se ha determinado también que STAT3 participa de manera directa en la transcripción del gen de *mdr1*, en células de leucemia mieloide aguda (K560) resistentes a la acción farmacológica de la andriamicina (doxorubicina) ²⁶. A pesar de avances en el conocimiento de la actividad y regulación de esta proteína, aún no se ha dilucidado completamente cuales son los mecanismos que regulan su expresión. Diversos esfuerzos se han realizado para tratar de entender los mecanismos a través de los cuales, los factores de transcripción regulan la expresión de proteínas involucradas en resistencia a drogas anti-cancerígenas. Esto mediante la utilización de algoritmos que ayudan a predecir si una secuencia promotora en particular tiene sitios consenso de unión a factores de transcripción específicos.

Nuestro grupo de trabajo ha empleado el programa TESS (Transcription Element Search System) el cual conjuga las bases de datos de TRANSFAC v6.0, JASPAR 20060301, IMD v1.1 y CBI/Gibbs Mat v1, para analizar 2000 nucleótidos río arriba de la secuencia ATG (sitio de inicio de la transcripción) del promotor del gen *mdr1* para predecir los factores de transcripción presente en esta región. Se encontraron cuatro sitios de unión para el factor de transcripción Ying-Yang 1 en el promotor del gen *mdr1* ubicados a -270, -1230, -1420 y -1860, lo cual sugiere que puede participar en la regulación transcripcional de dicho gen.

2.5 Factor de transcripción Ying-Yang1 (YY1)

Yin Yang 1, también conocido como YY1, δ , NF-E1, UCRBP y CF1, es un factor de transcripción ubicuo y multifuncional con dedos de zinc, miembro de la familia de proteínas polycomb que pertenece al grupo de receptores del gen homeobox, que juegan un papel fundamental en la hematopoyésis y control del ciclo celular. El gen YY1 se compone de cinco exones altamente conservado que codifica una proteína de 414 aminoácidos de longitud y peso molecular estimado de 68 kDa. En el ser humano el gen YY1 produce ocho diferentes transcritos (a, b, c, d, e, f, g, y h) generado por “splicing” alternativo, que codifica ocho diferentes isoformas ²⁷.

YY1 está involucrado en el control transcripcional de un gran número de genes de mamíferos, aproximadamente el 10% del total de los genes. En consecuencia, YY1 juega un papel importante en una serie de procesos biológicos, incluyendo el control del ciclo celular, la embriogénesis, infección viral, la apoptosis, oncogénesis, y el desarrollo de células B. Los niveles de expresión de YY1 deben estar bien controlados para la supervivencia de las células. En consecuencia, la alteración en los niveles de la proteína han demostrado que causan defectos en la proliferación celular y diferenciación, el desarrollo neuronal y se relaciona estrechamente con la aparición de enfermedades como el cáncer ²⁷.

Varios estudios han determinado el papel de YY1 en la tumorigénesis y su interacción con la regulación del ciclo celular. Se ha encontrado que YY1 interactúa con p53 e inhibe su actividad transcripcional, interrumpiendo así la interacción entre p53 y su coactivador p300, lo cual induce alteración en el ciclo celular ²⁸.

El factor de transcripción YY1 es transportado rápidamente al núcleo celular en respuesta a varios estímulos de apoptosis, diversos estudios han demostrado que YY1 tiene un papel crucial como disparador de carcinogénesis, se sabe que YY1 regula negativamente la transcripción del gen Fas, uniéndose a la región silenciadora del promotor de este gen. El tratamiento de líneas celulares tumorales con un donador de óxido nítrico induce la sobreexpresión de Fas, ya que el óxido nítrico inactiva al factor de transcripción YY1 (mediante S-nitrosilación), lo cual induce la sobreexpresión de Fas y por tanto, la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor. Otros trabajos en líneas celulares de cáncer de próstata y de ovario demostraron que YY1 también regula de forma negativa la expresión de DR5, que es uno de los receptores para TRAIL ^{29,30,31,32}. También, se ha demostrado que líneas celulares de cáncer de próstata resistentes a tratamiento presentan mayor expresión de YY1, en comparación con las células epiteliales normales de próstata,

hecho corroborado en un estudio de microarreglo de tejidos utilizando más de 250 pacientes con cáncer de próstata con diferente grado de malignidad ³³.

Por otro lado se ha descrito que YY1 está involucrado en la diferenciación de las células pro-B en la recombinación de las cadenas VH a DHJH, paso importante en el desarrollo de las células B ³⁴.

Lo anterior sugiere que YY1 pudiera regular de manera transcripcional al gen *mdr1* y por lo tanto participar de manera importante en los mecanismos de quimiorresistencia en LLA, actualmente no existen estudios que lo demuestren.

3. JUSTIFICACIÓN.

La leucemia es una neoplasia maligna caracterizada por la proliferación descontrolada de células hematopoyéticas en la médula ósea y es la causa más común de cáncer en niños en México y en todo el mundo. Dentro de las diversas categorías de leucemias, la LLA es la de mayor frecuencia en población infantil. El Hospital Infantil de México Federico Gómez recibe a través de su departamento de Oncología, un promedio de 80 pacientes nuevos al año y mantiene una población en tratamiento oncológico de alrededor de 450 pacientes.

Aun cuando en la práctica clínica se ha demostrado, la gran eficiencia de los agentes quimioterapéuticos, el desarrollo de resistencia a estos fármacos por las células tumorales continúa siendo una de las principales causas de falla al tratamiento, en pacientes con este tipo de cáncer, lo que pone en riesgo el éxito de la quimioterapia y puede cambiar el pronóstico de la enfermedad. Los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno no han sido totalmente elucidados, pero su estudio podría tener impacto tanto en el conocimiento básico de la enfermedad, como en el empleo de nuevos y/o mejores factores pronósticos y blancos terapéuticos.

4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos y regímenes de tratamiento para la LLA, entre el 25 y 30% de los pacientes desarrollan resistencia a estos tratamientos y no sobreviven. Una de las principales barreras que no permite que el tratamiento tenga éxito es el desarrollo de quimiorresistencia, debida a la expresión de proteínas expulsoras de agentes tóxicos en las células leucémicas, entre las que destaca la sobreexpresión de MDR1. Una vez que las células se vuelven resistentes a los fármacos, las opciones de tratamiento son muy limitadas, pues el grado de resistencia va en aumento, incluso a aquellos fármacos a los que no se ha expuesto. Para poder mejorar la respuesta al tratamiento de la LLA, es esencial desarrollar estrategias efectivas para revertir la resistencia.

Recientemente, se identificó que el promotor del gen *mdr1* contiene 4 sitios específicos de unión para el factor de transcripción YY1; lo que hace posible que este factor de transcripción actúe como un regulador del gen *mdr1*. Se ha descrito que el factor de transcripción YY1 juega un papel fundamental en procesos biológicos como embriogénesis, diferenciación, proliferación celular y carcinogénesis. Estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo, en colaboración con la UCLA han demostrado que la sobre-activación de YY1 en células tumorales representa un mecanismo de resistencia a la apoptosis. La participación de YY1, en los mecanismos de resistencia a drogas es aún desconocida, consecuentemente, resulta importante establecer si existe una asociación entre la expresión de YY1 y MDR1 y si la expresión de estas proteínas correlacionan con la respuesta al tratamiento y los factores de riesgos en pacientes con LLA.

5. HIPÓTESIS

El factor de transcripción YY1 regula positivamente la expresión del gen de *mdr1*, promoviendo un aumento en la expresión de la proteína MDR1, lo cual correlaciona directamente con factores de mal pronóstico y mala respuesta a la quimioterapia en pacientes pediátricos con LLA.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la regulación transcripcional del gen de *mdr1* por el factor de transcripción YY1, su expresión en las diferentes etapas de quimioterapia y su correlación con los factores pronóstico de respuesta al tratamiento en la LLA

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación del gen *mdr1*.
2. Evaluar la interacción del factor de transcripción YY1 y la región promotora del gen *mdr1*.
3. Evaluar la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes pediátricos con LLA.
4. Evaluar la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes pediátricos con LLA en las diferentes etapas de quimioterapia.
5. Evaluar la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes pediátricos con LLA y los factores de riesgo que determinan su respuesta al tratamiento quimioterapéutico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Ensayos de plásmidos reporteros

Para evaluar la participación del factor de transcripción YY1 en la regulación del gen de *mdr1* se realizaron ensayos de plásmidos reporteros, para lo cual se analizaron 2000 nucleótidos río arriba de la secuencia ATG del promotor del gen *mdr1*, para predecir los sitios de unión para YY1 en el promotor del gen *mdr1* mediante el programa TESS.

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar las secuencias de DNA que fueron analizadas, los cuales presentaban una mutación en la secuencia para cada uno de los sitios predichos y contenían secuencias de restricción específicas. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados y obtenidos por la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los sitios de unión de YY1 al promotor de *mdr1*

NOMBRE	SECUENCIA	CARACTERÍSTICAS
MDR1	5' CCAA GGTACC GCTAACACAGTGAAAAACCCAG 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , contiene el sitio de restricción Kpn I.
MDR2	5' CCAA AAGCTT CCGACCTGAAGAGAAACC 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , contiene el sitio de restricción Hind III.
270F	5'CTCTTCATATGTGCGGGGACCTG CTCTCTGA 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -270 de unión para YY1, contiene el sitio de restricción NdeI.
270R	5'TTATCCATATGTCCAGTGCCACTA CGGTTTG 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -270 de unión para YY1, contiene el sitio de restricción NdeI.
1230F	5'TATTTGCTAGCCCCAATGATTCA GCTGATGC 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -1230 de unión para YY1, contiene el sitio de restricción NheI.
1230R	5'TATAAGCTAGCGACACGACTTTCA AAGTTCAC 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -1230 de unión para YY1, contiene el sitio

		de restricción NheI
1420F	5'AATTAGAATTCCGGATGAACAGATG TAACTCAGAAACTGTC 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -1420 de unión para YY1, contiene el sitio de restricción EcoRI.
1420R	5'CATGAGAATTCTAGAGACAGGTA TTTCAAGGTACAA 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -1420 de unión para YY1, contiene el sitio de restricción EcoRI
1860F	5'CATTGATATCATCCTCAGACTAT GCAGTAAAAAAC 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -1420 de unión para YY1, contiene el sitio de restricción EcoR5
1860R	5'TATTCGATATCCCACTTTCTTTAA ATAACACATACTTCAAAGCC 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen <i>mdr1</i> , presenta la mutación para el sitio -1420 de unión para YY1, contiene el sitio de restricción EcoR5
pCMV PF	5'TATATACTCGAGCTGCTTATATAG ACCTCCCACCG 3'	Sentido. Secuencia del promotor del gen CMV, contiene el sitio de restricción Xba I.
pCMV PR	5'CATACATCTAGAACGGGGTCATT AGTTCATAGCC 3'	Antisentido. Secuencia del promotor del gen CMV, contiene el sitio de restricción Xho I.

Para los ensayos de plásmidos reporteros se utilizó la línea celular PC3 (obtenida a partir de adenocarcinoma de próstata, grado IV), de crecimiento adherente, con aplicación en ensayos de transfección (ATCC: CRL-1435). La línea celular fue cultivada en medio RPMI GIBCO/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), suplementado con L-glutamina, piruvato, penicilina, antibiótico-antimicótico y complementado con SFB al 10%, a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5%

La amplificación de las secuencias empleadas en el protocolo se realizó con el equipo Mastercycler Gradient Eppendorf (Westbury, NY, USA). La reacción se llevó con 35 ciclos de desnaturalización y polimerización a 68°C. Se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa.

Las digestiones se realizaron, durante dos horas a 37°C, con cada una de las enzimas de restricción y se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis. Los fragmentos se

obtuvieron a partir de los geles de agarosa y se purificaron mediante el Kit Pure Link Quick Gel Extraction Invitrogen, siguiendo las especificaciones del fabricante y se realizó la electroforesis para verificar la presencia del DNA. Se incubaron el plásmido pGL3 y el DNA durante toda la noche a 4°C en una proporción (1:3). Se utilizaron 3 µl de DNA, la enzima T4 DNA ligasa Invitrogen. Las características de los plásmidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Características de los plásmidos empleados.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS
pGL3	Plásmido reportero de clonación Promega (Fitchburg, WI, USA).
CMV /pGL3	Contiene la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV).
MDR1/pGL3	Contiene la secuencia completa del promotor de <i>mdr1</i> .
MDR/270	Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> , con la mutación para el sitio-270 de unión a YY1.
MDR/1230	Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> , con la mutación para el sitio-1230 de unión a YY1.
MDR/1420	Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> , con la mutación para el sitio-1420 de unión a YY1.
MDR/1860	Contiene la secuencia del promotor de <i>mdr1</i> , con la mutación para el sitio-1860 de unión a YY1.

Se utilizó la cepa bacteriana *E. coli DH5 α* Invitrogen para la propagación de los plásmidos estudiados utilizando el volúmen total de ligación, la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos y posteriormente se llevó a 42°C durante 1 minuto, posteriormente se mantuvo en hielo durante 3 minutos. Se adicionó medio enriquecido SOC (250 mM de KCl, 100 mM de MgCl₂, 2 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 20 mM de glucosa para un litro) y se incubó a 37°C en agitación durante hora y media. La mezcla en una placa de medio Luria-Bertani (con 75 µg/mL de ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C.

Las colonias resistentes al antibiótico ampicilina se sembraron en placas y se dejaron crecer en caldo Luria Bertani durante 18 horas a 37°C en agitación, posteriormente se purificó el DNA

plasmídico empleando el Kit Pure Link Hipure Plasmid Miniprep Invitrogen, siguiendo las recomendaciones del fabricante y se verificó el producto mediante electroforesis.

El DNA plasmídico se introdujo en las células PC3 empleando el método de lipofectamina 2000 Invitrogen, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, un total de 2×10^5 células/pozo se crecieron en placas de 24 pozos durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó una mezcla de 1000 ng de DNA con un 1 μ l de lipofectamina a cada pozo, se incubó durante cuatro horas. Se dejaron en cultivo las células durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂. Al siguiente día se hizo la cuantificación de Unidades Relativas de Luciferasa (URL) en un luminómetro marca Turner Biosystems, empleando 20 μ l de lisado de células y añadiendo 100 μ l de sustrato para luciferasa Promega (Fitchburg, WI, USA)

7.2 Inmunoprecipitación de cromatina (ChiP)

Para determinar la interacción del factor de transcripción YY1 y los sitios de unión identificados para el promotor del gen de *MDR1*, se realizó ChiP de la línea celular RS4;11 (Línea celular obtenida a partir de leucemia linfoblástica aguda de humano de fenotipo B, con crecimiento en suspensión ATCC: CRL-1873) para la cual se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- IgG Normal Rabitt Santa Cruz, Biotechnology (Delaware, CA, USA).
- Anticuerpo policlonal Anti-YY1 de humano hecho en conejo Santa Cruz, Biotechnology.

Se utilizó el kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System Invitrogen, y de acuerdo a las especificaciones del fabricante se procedió al ChiP con anticuerpo específico para YY1, la metodología seguida se describe brevemente a continuación.

Se cultivó la línea celular RS4;11, con medio RPMI GIBCO/Invitrogen, suplementado con L-glutamina, piruvato, penicilina, antibiótico-antimicótico y complementado con suero fetal de bovino al 5%, en un ambiente CO₂ al 5% a 37°. Las células se cosecharon y utilizaron 1×10^6 células, se resuspendieron en regulador de fosfatos 1X(PBS), se fijaron con formaldehído a una concentración final de 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se utilizó glicina 0.125 M para detener reacción de entrecruzamiento incubando 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 1650 rpm a 4° por 10 minutos y se lavaron las células con PBS frío. Se fragmentó el DNA utilizando un sonicador 130-Watt Ultrasonic Processor, Cole-Parmer Instrument Co., (Vernon Hills, IL, USA) las condiciones de sonicación fueron 8 ciclos de 30 segundos a 60% de potencia, en hielo, para obtener fragmentos de 500 pares de bases.

Se acoplaron los anticuerpos con las perlas magnéticas unidas a proteínas A/G, para lo cual se adicionó 1 ug de anticuerpo de YY1 y de IgG de conejo y se pusieron en agitación a 4° durante hora y media.

Se hizo una dilución de la cromatina para tener una concentración de 50 000 células por reacción, se adicionaron los anticuerpos acoplados a perlas magnéticas y dejaron incubar por 3 horas en agitación a 4°C. Se lavó la cromatina 6 veces y liberaron las perlas magnéticas incubando a 55°C por 15 minutos, y se revirtió el entrecruzamiento incubando a 65°C durante 15 minutos. Se purifico el DNA utilizando perlas magnéticas, e incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, se lavó 2 veces, y liberaron las perlas magnéticas de purificación de DNA incubando a 55°C, se obtuvo el DNA inmunoprecipitado.

Para evaluar la interacción de los cuatro sitios del promotor de *mdr1* con el factor de transcripción, se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan los sitios de unión, y amplificaron los segmentos mediante PCR.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los segmentos inmunoprecipitados

Sitio (región del promotor que flanquea)	Secuencia
270 (-482/-84)	Sentido 5'-GGGCTTCTTGAGGCGTGGATAGTGTGA- 3'
	Antisentido 5'-GTCGAAGCCAGAGAGCAGTAAGAGGGA- 3'
1230 (-1100/-771)	Sentido 5'-GGAAGCAGAAAGGTGATACAGAATTGGAGAGGTCGG-3'
	Antisentido 5'-CAGCCAATCAGCCTCACCACAGATGACT-3'
1420 (-1322/-1064)	Sentido 5'-AACACGGGCATTGATCTGACGTCTG-3'
	Antisentido 5'-CCGACCTCTCCAATTCTGTATCACCTTTCTGCTTCC-3'
1860 (-1930/-1467)	Sentido 5'-AGGCTGAGGCAGGAGAATGGTGTGAAC-3'
	Antisentido 5'-CTGAGGAAAAGTACGTGCAATCTGCAC-3'

Los fragmentos de DNA fueron amplificados utilizando las secuencias ya descritas y el protocolo se realizó con el equipo Mastercycler Gradient Eppendorf. Se emplearon oligonucleótidos específicos para cada secuencia (20 pmol), DNA genómico como molde (40 ng) y 1 U de la enzima Tac Platinum Polimerasa Invitrogen. La reacción se llevó a un volumen final de 50 µl, con 35 ciclos de desnaturalización y polimerización a 68°C. Se evaluó el producto obtenido mediante electroforesis y finalmente fue fotodocumentado (Bio-Imaging Systems, Mini Bio Pro 2.0).

7.3 Pacientes

Se estudiaron muestras de sangre periférica de 88 pacientes pediátricos entre 0-16 años, masculinos y femeninos, con diagnóstico de LLA de *novo* que fueron hospitalizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez y el Hospital Pediátrico Moctezuma, dichas muestras fueron proporcionadas por el servicio de Hemato-oncología, así como 53 muestras de sangre periférica de niños que no presentaban ningún tipo de patología hematológica, los cuales fueron utilizados como controles que fueron proporcionadas por el servicio de laboratorio clínico central del Hospital Infantil de México Federico Gómez. La toma de la muestra de los pacientes con LLA se realizó al diagnóstico (día 0), al finalizar la etapa de remisión (día 28) y al término de la consolidación (90 días de iniciar el tratamiento).

Una vez seleccionados los pacientes que reunieron los criterios de inclusión, aceptación y firma de carta de consentimiento informado, se les tomó la muestra para el desarrollo de este estudio y se recabaron los datos clínicos de cada uno durante su evolución terapéutica.

Criterios de inclusión

- ↪ Edad de 0-18 años
- ↪ Pacientes femeninos y masculinos
- ↪ Con diagnóstico de LLA confirmado por estudio morfológico, e inmunofenotipo.
- ↪ Pacientes de reciente diagnóstico sin tratamiento previo
- ↪ Consentimiento informado

Criterios de exclusión

- ↪ Muestra insuficiente.

Criterios de eliminación

- ↪ Abandono del tratamiento antes de completar la fase de inducción.

7.4 Purificación de células mononucleares de sangre periférica

La purificación de células mononucleares (CMN) de sangre periférica se realizó mediante la técnica de separación por gradiente, por centrifugación; empleando Ficoll-PaqueTMPLUS GE Healthcare (Little Chalfont, United Kingdom), se realizó una mezcla de Ficoll con la muestra de sangre problema guardando una relación v/v de 2:1; posteriormente se centrifugó a 1,750 rpm por 25 minutos a 4°C. Después se llevó a cabo la separación de la capa de células

mononucleares y se realizaron dos lavados con PBS 1X y se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 1, 750 rpm a 4°C.

7.5 Preparación de laminillas

Después de la purificación de células, se llevó a cabo su conteo para lo cual fueron teñidas con azul tripano y contadas en la cámara de Neubauer, se ajustó la cantidad de células a 10 000 células/10µL por punto para cada laminilla. Se dejó secar a temperatura ambiente y se fijaron las células con formaldehído al 4% por 20 minutos a 4°C. Posteriormente se llevó a cabo un lavado de PBS 1X por 5 minutos.

7.6 Inmunocitoquímica

Para evaluar la expresión de MDR1 y YY1 se utilizaron anticuerpos específicos para estas proteínas:

- IgG Normal Rabitt Santa Cruz, Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal Anti-MDR1 de humano hecho en conejo Santa Cruz, Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal Anti-YY1 de humano hecho en conejo Santa Cruz, Biotechnology.

Se hidrataron las células con un lavado en PBS 1X durante 5 minutos y se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio (pH 6.0, 0.01M), por 20 minutos a 90 °C en baño María con agitación, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos, 2 veces. Se bloqueó la unión no específica de los anticuerpos a las células, incubando las muestras con suero normal de cerdo al 2% durante 1 hr temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos correspondientes (anti-MDR1 dilución 1:500 o anti YY1 dilución1:750) en cámara húmeda. Después de lavar con PBS 1X, las laminillas se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado a biotina por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS se adicionó estreptavidina conjugada a HRP Dako (Vancouver, BC, Canadá) por último el color se generó mediante la adición del substrato cromógeno denominado Diamino-Benzidina (Dako); se detuvo la reacción con agua y se contratiñó con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron bajo las siguientes condiciones: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xileno, finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina. Para eliminar lo más posible la

variabilidad inter-ensayo todas las muestras fueron inmunoteñidas al mismo tiempo en un solo experimento.

7.7 Cuantificación de células positivas inmunoteñidas

Las laminillas se analizaron al microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos por cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes Image-Pro Plus®, Media Cybernetics (Silver Spring, MD, USA). Se contaron 100 células en cada laminilla, para obtener el % de células positivas a la inmunotinción.

7.8 Cuantificación de intensidad de expresión en células inmunoteñidas

Las laminillas analizadas al microscopio (Olimpus, BX-40) y la intensidad de expresión de YY1 y MDR1 en las células positivas (color café) se analizaron 10 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes, Image-Pro Plus®, Media Cybernetics. Se midió la intensidad de la expresión mediante la asignación numérica teniendo un valor de 0 aquellas células que no presentaban expresión, 1 aquellas con baja expresión, 2 células con mediana expresión y 3 para aquellas células con alta expresión, para obtener el intensidad de expresión en células positivas a la inmunotinción.

7.8 Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando un programa de análisis estadístico Prisma 4® de GraphPad (San Diego, CA, USA). La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la intensidad de la expresión de la reacción inmunocitoquímica, se realizó mediante análisis de t- Student y de varianza (ANOVA) y un análisis de Tukey para evaluar la diferencia entre los diferentes grupos. Para los análisis de correlación se utilizó una prueba de Pearson. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

8. RESULTADOS

8.1 Interacción de YY1 con la región promotora del gen de *mdr1*

Para determinar si el factor de transcripción YY1 participa en la regulación del gen de *mdr1* de manera directa y si existe interacción biológica entre este factor de transcripción y la región promotora de este gen, fueron evaluados los sitios predichos de unión mediante ensayos con plásmidos reporteros, utilizando el plásmido PGL3, el cual posee una región de multiclonación, en donde se inserto la región promotora del gen de *mdr1* (2000 pb) y las diferentes mutaciones en cada uno de los sitios de unión predichos, donde YY1 puede unirse a *mdr1*, la figura 3 muestra la representación esquemática de los cuatro sitios para YY1 en el promotor de *mdr1*. Mediante ensayos de transfección en la línea celular PC3 se encontró que la actividad del gen reportero (Luciferasa), disminuye como resultado de las mutaciones, esta disminución es estadísticamente significativa ($p < 0.05$ ANOVA, promotor completo vs promotor mutado) siendo más evidente para los sitios -270 y -1820.

Para evaluar si existe interacción biológica entre YY1 y el promotor de *mdr1* se utilizó ChiP, a partir de extractos nucleares de la línea celular de leucemia linfoblástica aguda RS4;11. La figura 4 muestra la representación esquemática de cada uno de los sitios donde YY1 interactúa con el promotor del gen de *mdr1*; del lado derecho se muestran los amplicones de los segmentos inmunoprecipitados mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos que flanquean cada uno de los cuatro sitios donde YY1 se une al promotor de dicho gen, se observa claramente que el sitio que se encuentra mayormente afectado es el -1420, seguido del -1230 de la región promotora de *mdr*, lo que indica que hay mayor interacción en estos sitios, no obstante se puede observar que interacciona con los dos sitios restantes.

Por los resultados anteriores se demuestra que YY1 regula de manera transcripcional a *mdr1* y se une de manera directa a la región promotora de dicho gen.

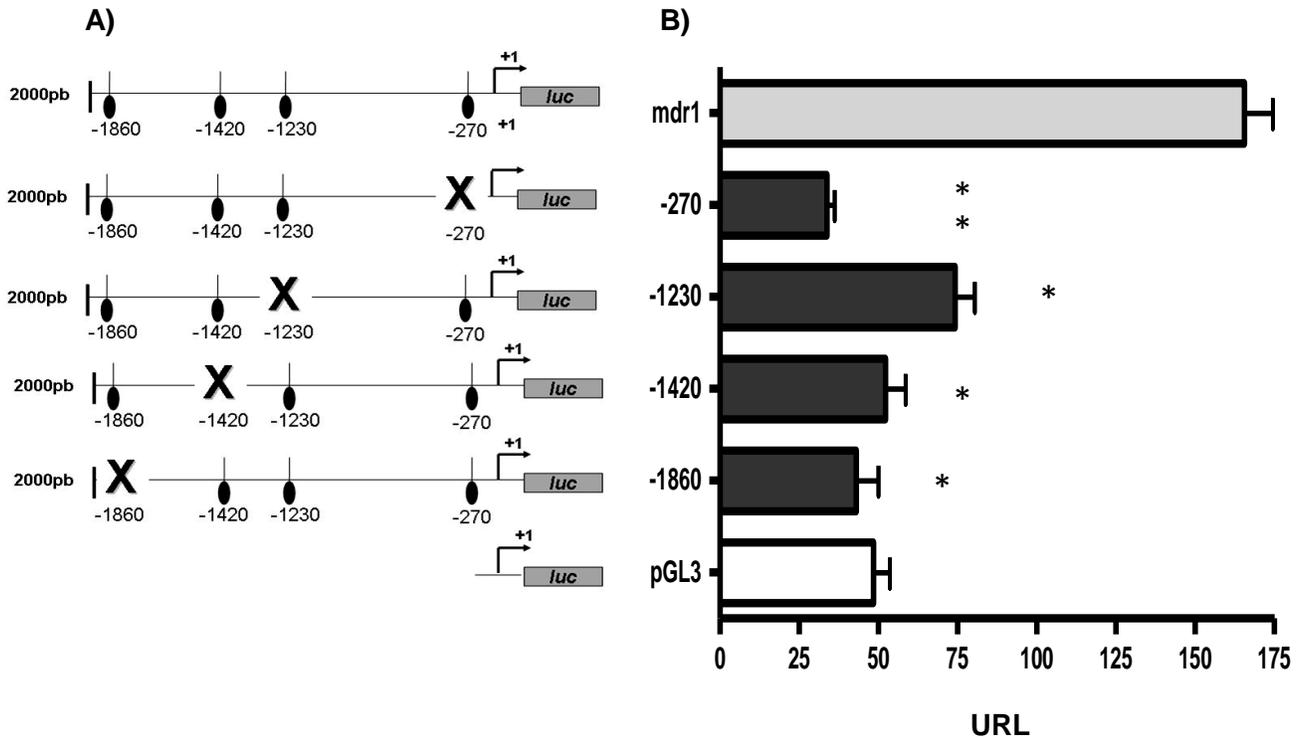


Figura 3. Regulación del gen de *mdr1* por el factor de transcripción YY1. Se utilizaron ensayos de transfección en la línea celular PC3, para evaluar el efecto de la mutación sitio dirigida para cada una de las secuencias de unión de YY1 a la región promotora del gen de *mdr1*, localizados a -270, -1230, -1420 y -1860 pb río abajo del inicio de la transcripción: **A)** se muestra los sitios mutados. **B)** se muestra la representación grafica de la lectura de las unidades relativas de luz (URL) obtenidas en el ensayo para cada una de las mutantes, se puede observar que hay diferencia con respecto al promotor completo del gen de *mdr1* (control positivo) y el plásmido PGL3 vacío (control negativo) ($p= 0.05$ ANOVA). Resultado representativo de tres experimentos independientes.

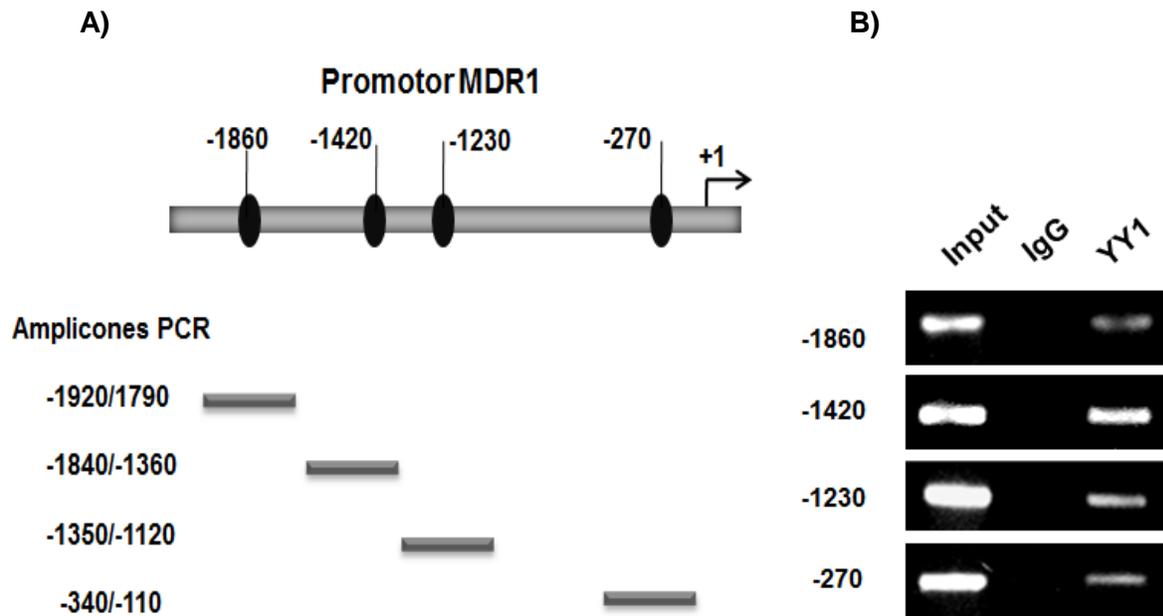


Figura 4. YY1 se une al promotor del gen de *mdr1*. Inmunoprecipitación de YY1 a partir de extractos nucleares de la línea celular leucémica RS4;11. **a)** Se muestra la representación esquemática de cada uno de los sitios donde YY1 interactúa con el promotor del gen de *mdr1*; **b)** se muestra la amplificación de los segmentos inmunoprecipitados mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos de cada uno de los cuatro sitios en donde YY1 se une al promotor del gen de *mdr1*. Podemos observar que el sitio -1420 de la región promotora del gen de *mdr1* es el que presenta una mayor interacción con YY1 en comparación con los 3 sitios restantes. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

8.2 Análisis Clínico

De acuerdo a los criterios de inclusión de propuestos se realizó la toma de muestra de sangre periférica (previo consentimiento informado) de los pacientes con diagnóstico de LLA incluidos en el protocolo y se analizaron los expedientes. Se obtuvieron un total de 88 muestras de sangre periférica de pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de LLA en un periodo comprendido de Septiembre del 2009 a Septiembre 2011, con edades que oscilaban de 0 a 16 años. Se encontró la siguiente distribución: 39 pacientes del sexo masculino y 49 del femenino, la edad promedio fue de 7.5 años, de estos pacientes a 30 se les tomó muestra al final del tratamiento de inducción, de los cuales 19 fueron del sexo femenino y 11 del sexo masculino. Se obtuvieron 10 muestras de pacientes que concluyeron la etapa de consolidación de quimioterapia, a 7 del sexo femenino y 3 al sexo masculino. Por otra parte, se obtuvieron muestras de sangre periférica de 53 pacientes pediátricos que no presentaban ningún problema hematológico y/o infeccioso para ser considerados como grupo control, con edades que oscilaban de 5 a 13 años, de los cuales 23 pertenecían al sexo femenino y 30 al sexo masculino con edad promedio de 7.3 años, las características generales de los individuos que fueron incluidos en este estudio se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Características generales de los sujetos de estudio

	Pacientes con LLA	Controles
n=	88	53
Femenino	49	23
Masculino	39	30
Edad	7.5 años (0.1-16 años)	7.3 años (5-13 años)
Individuos con inducción a la remisión	30	-
Individuos con consolidación de quimioterapia	10	-
Muertes	19	-

8.3 Evaluación de la expresión de YY1 y MDR1.

Los resultados del análisis de expresión de YY1 y MDR1 de un ensayo representativo por inmunocitoquímica, se muestran en la figura 5, donde podemos observar que tanto la expresión de YY1 (Fig. 5d) como de MDR1 (Fig. 5e) se muestra un aumento en las CMN de los pacientes con LLA en comparación con las muestras de los individuos control (Fig. 5b, 5c), en los que se muestra menor expresión de ambas proteínas. YY1 se encuentra expresada principalmente a nivel nuclear, mientras MDR1 se encuentra a nivel de membrana y citoplasma principalmente. Como control de especificidad de la tinción se utilizó inmunoglobulinas normales de conejo (Fig. 5a).

En las figuras 6 y 7, se presentan los porcentajes de expresión de células positivas tanto para YY1 (Fig. 6A) como para MDR1 (Fig. 7A), en los pacientes con LLA en comparación con el grupo control. Se puede observar que existe un aumento en el porcentaje de células positivas para ambas proteínas en las muestras de los pacientes con LLA en comparación al grupo control, la cual fue estadísticamente significativa ($p=0.0001$, t-Student).

Por otro lado se evaluó la intensidad de expresión de ambas proteínas clasificándola como de baja (BI), mediana (MI) y alta intensidad (AI), de acuerdo a los valores obtenidos por el análisis de microscopía, que van desde 0.1-1, 1.1-2 y 2.1-3 respectivamente. Los datos obtenidos se muestran en las figuras 6B y 7B, en las que se observa que la intensidad de expresión de YY1 (Fig. 6B) como de MDR1 (Fig. 7B) es mayor en pacientes con LLA comparado con los individuos control. De manera interesante en el grupo control el grado de expresión es considerado en su mayoría como de baja intensidad, mientras que los pacientes con LLA presentan en su mayoría niveles de alta intensidad de expresión para ambas proteínas, esta diferencia es estadísticamente significativa ($p<0.05$, ANOVA).

En el análisis de correlación entre el porcentaje de células positivas y la intensidad de dicha expresión para YY1 (Fig. 6C) como para MDR1 (Fig. 7C), en el grupo de pacientes con LLA demostró que existe una correlación entre el porcentaje de células positivas y la intensidad de expresión de ambas proteínas en pacientes con LLA ($r=0.29$, $p=0.0052$ intervalo de confianza 0.0922-0.4779 para el caso de YY1 y para el caso de MDR1 de $r=0.59$, $p=0.0001$ intervalo de confianza 0.4364-0.7129, ambos calculados por la prueba de Pearson).

En la figura 8A se puede observar que existe correlación positiva entre el porcentaje de células positivas tanto de YY1, como MDR1 ($r=0.33$, $p=0.0014$ intervalo de confianza 0.1348-0.5086,

Pearson). Esta correlación también se presenta con el grado de intensidad de expresión de ambas proteínas (Fig. 8B). ($r=0.4$ $p=0.0001$ intervalo de confianza 0.2072-0.5618, Pearson). Así se demuestra que el aumento de expresión de YY1 es directamente proporcional al aumento en la expresión de MDR1.

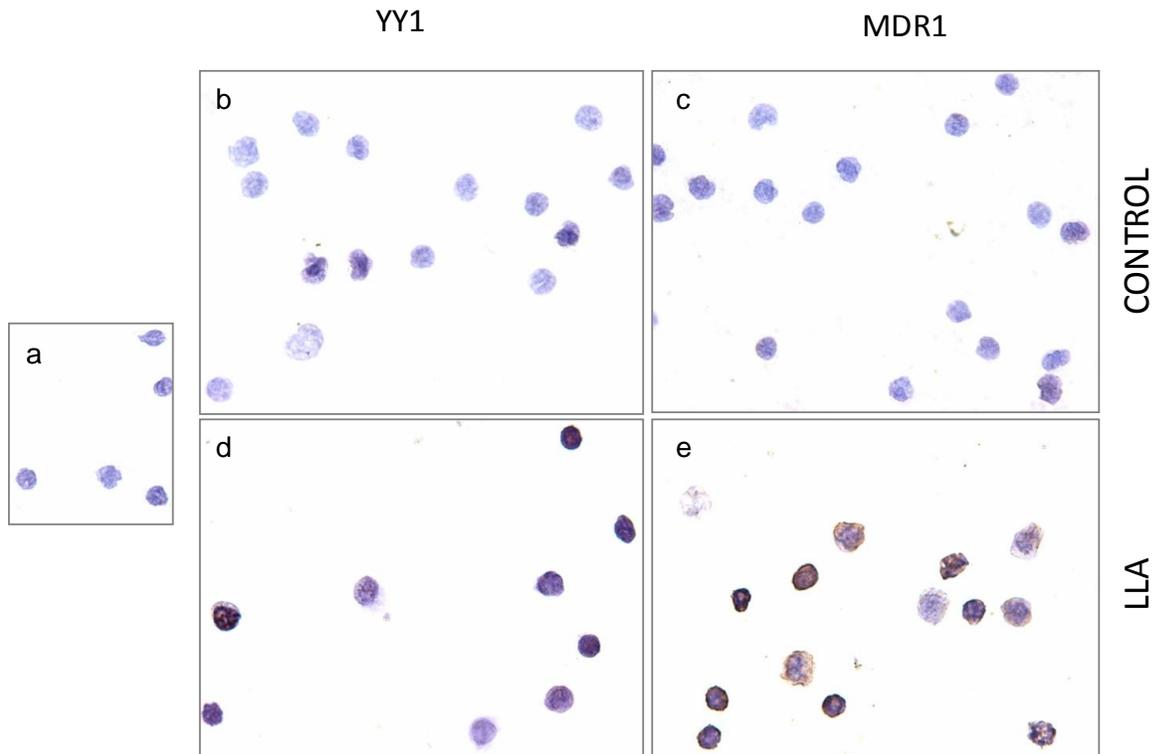


Figura 5. Microfotografía representativa del incremento de la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con LLA. Se observa que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLA (d y e) muestran mayor expresión de las proteínas YY1 y MDR1 en comparación con las células de individuos controles (b y c). Se observa tinción principalmente nuclear para YY1, y en el caso de MDR1 a nivel de membrana y citoplasma principalmente. El control de isotipo no muestra tinción(a). Aumento 100X.

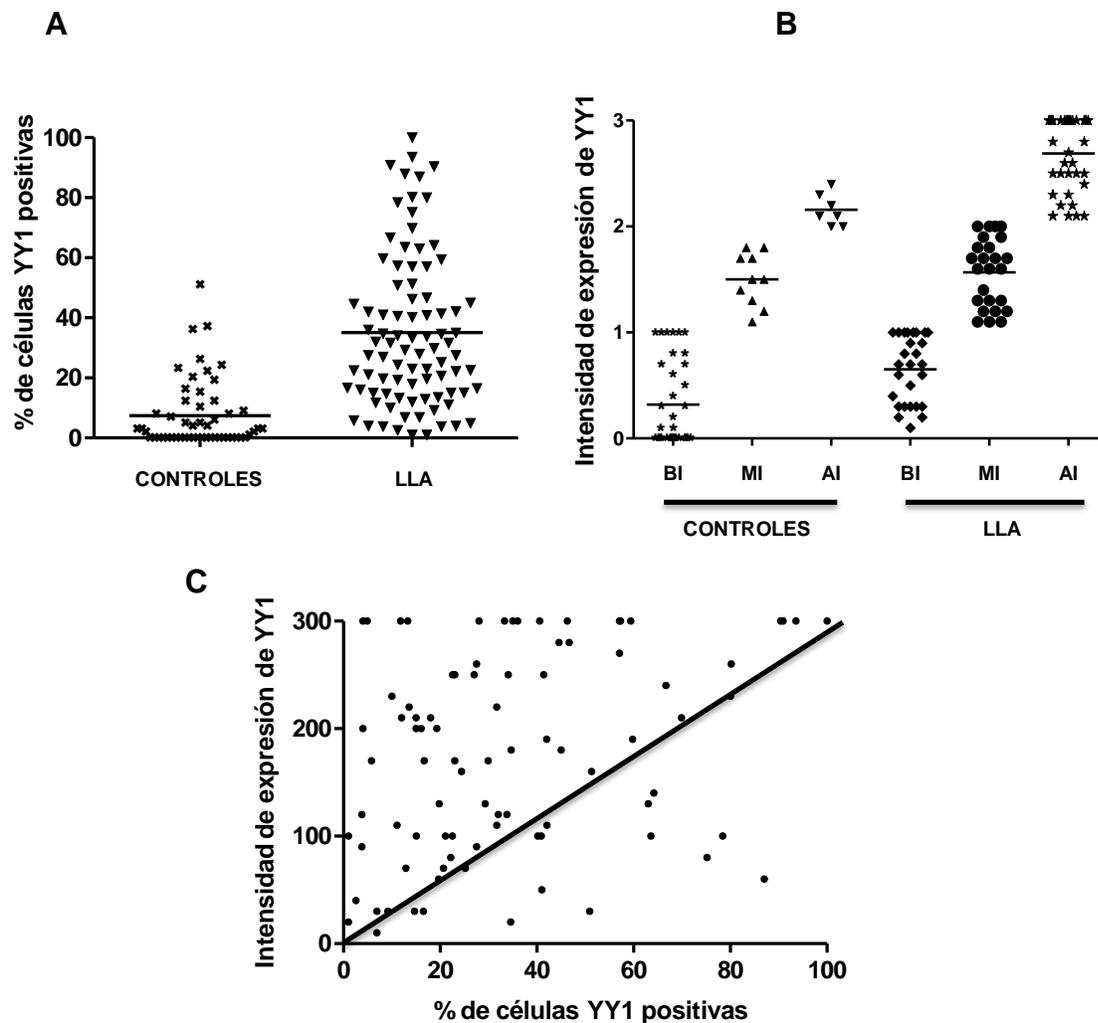


Figura 6. Cuantificación de la expresión de YY1 en pacientes con LLA. **A)** Porcentaje de células YY1 positivas de pacientes con LLA (n=88) e individuos controles (n=53). Se observa claramente un incremento en el porcentaje de células positivas en las muestras de los pacientes con LLA ($p=0.0001$ t-Student LLA vs Controles). **B)** Intensidad de expresión de YY1, en la grafica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), se observa que los pacientes con LLA muestran una mayor intensidad en la expresión en comparación con los niveles en los individuos control ($p<0.05$ ANOVA). **C)** Análisis de correlación entre el porcentaje de expresión y el grado de intensidad de expresión de YY1, se observa correlación entre el porcentaje de células positivas y el grado de intensidad de expresión de YY1 en los pacientes con LLA ($r=0.29$, $p=0.0052$ intervalo de confianza 0.0922-0.4779, datos calculados por la prueba de Pearson).

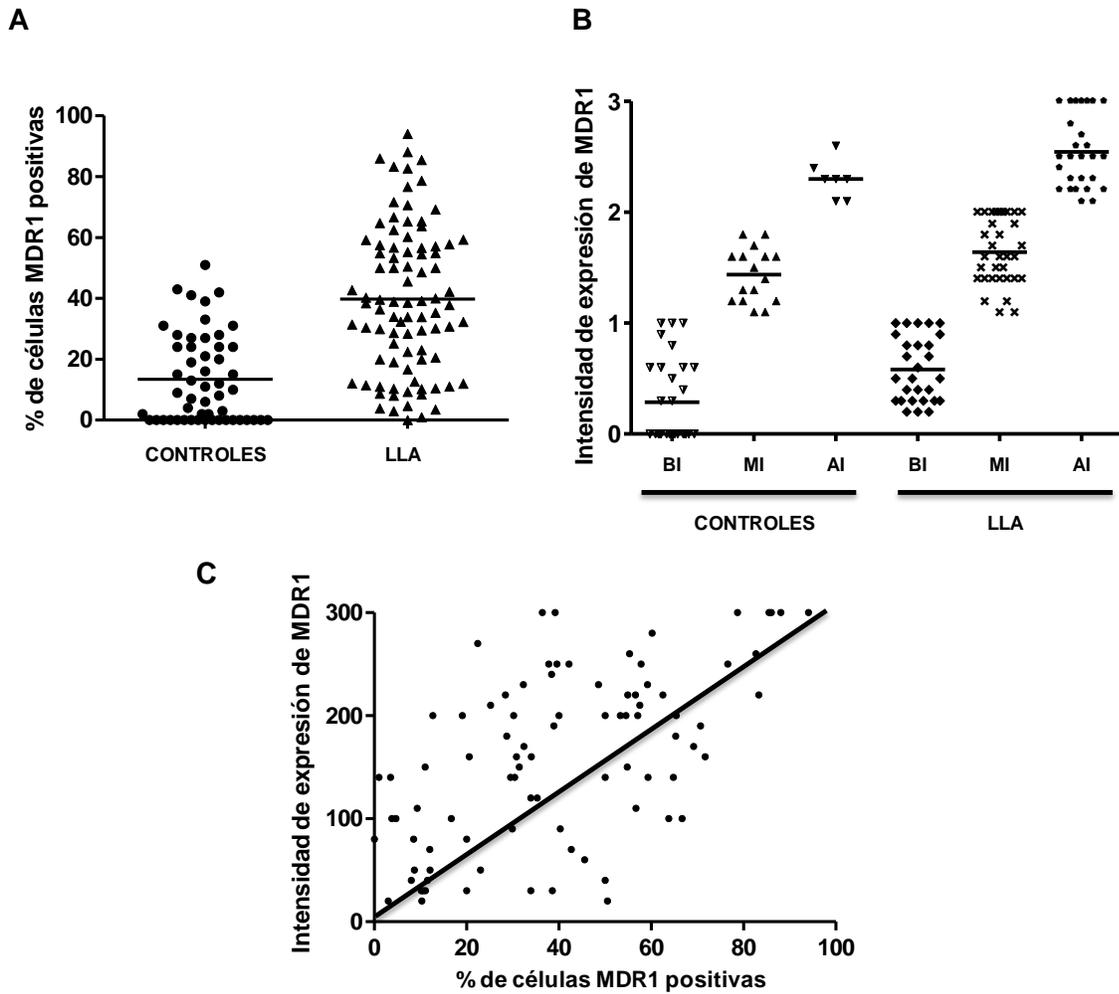


Figura 7. Cuantificación de la expresión de MDR1 en pacientes con LLA. **A)** Porcentaje de células MDR1 positivas de pacientes con LLA (n=88) e individuos controles (n=53). Se observa claramente un incremento en el porcentaje de células positivas en las muestras de los pacientes con LLA ($p=0.0001$ t-Student LLA vs Controles). **B)** Intensidad de expresión de YY1, en la grafica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), se observa que los pacientes con LLA muestran una mayor intensidad en la expresión en comparación con los niveles en los individuos control ($p<0.05$ ANOVA). **C)** Análisis de correlación entre el porcentaje de expresión y el grado de intensidad de expresión de MDR1, se observa correlación entre el porcentaje de células positivas y el grado de intensidad de expresión de MDR1 en los pacientes con LLA ($r=0.59$, $p=0.0001$ intervalo de confianza 0.4364-0.7129, datos calculados por la prueba de Pearson).

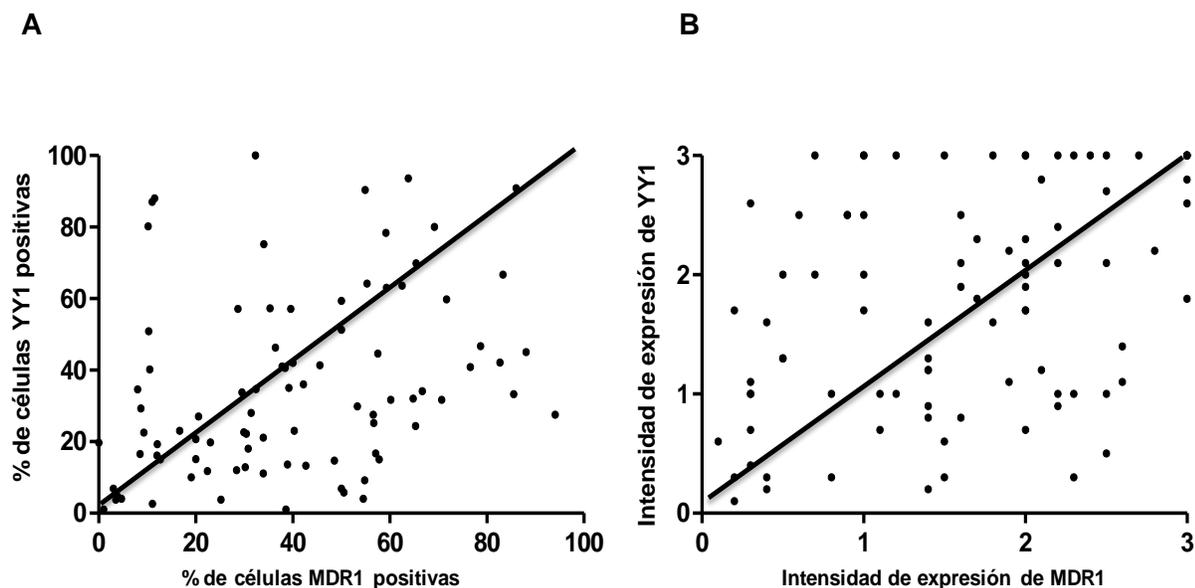


Figura 8. Correlación entre el porcentaje de células positivas y la intensidad de expresión para YY1 y MDR1. A) Análisis de correlación entre el porcentaje de células YY1 y MDR1 positivas. Se muestra que el porcentaje de células YY1 positivas es proporcional al porcentaje de células MDR1 positivas ($r=0.33$, $p=0.0014$ intervalo de confianza 0.1348-0.5086, datos calculados con la prueba de Pearson). **B)** Análisis de correlación entre la intensidad de expresión de YY1 y MDR1. Se muestra que la intensidad de expresión de YY1 es directamente proporcional con el grado de intensidad de expresión de MDR1 ($r=0.4$ $p=0.0001$ intervalo de confianza 0.2072-0.5618, datos calculados con la prueba de Pearson).

8.4 Expresión de YY1 y MDR1 después de las diferentes etapas de tratamiento

Para evaluar si la expresión de YY1 y de MDR1 presentaba cambios después de que los pacientes eran sometidos a las diferentes etapas de quimioterapia (inducción a la remisión y consolidación de quimioterapia), en comparación con la expresión de estas proteínas al diagnóstico, se determinó el porcentaje de células positivas e intensidad de expresión de ambas proteínas. En la figura 9 se muestra una microfotografía representativa de un paciente que ha concluido la etapa de inducción a la remisión, y podemos observar que hay aumento en la expresión de MDR1 (Fig. 9b) y de YY1 (Fig. 9c) en comparación con la expresión de estas proteínas al diagnóstico (Fig. 9 a, c) mostrando una tinción principalmente nuclear para el caso de YY1 y a nivel de citoplasma y membrana para MDR1. En las figuras 10A y 11A se muestra que hay cambio en el porcentaje de células positivas para YY1 y MDR1, en las muestras de los pacientes que finalizaron la etapa de inducción a la remisión comparado con el porcentaje de expresión presentado al diagnóstico ($p > 0.02$ t-Student en ambos casos). Resultados muy similares encontramos con la intensidad de expresión tanto para YY1 (Fig. 10B) como de MDR1 (Fig. 11B), se puede observar que los pacientes que han finalizado la etapa de inducción a la remisión no presentan diferencias ($p > 0.05$ ANOVA en ambos casos), cabe destacar que la mayoría de los pacientes presentan una expresión de ambas proteínas clasificada como de alta intensidad en comparación con lo mostrado al momento del diagnóstico, en donde la expresión para YY1 y MDR1 es considerado como de mediana intensidad. Se realizó un análisis de correlación entre el porcentaje de células positivas y el grado de intensidad, y los resultados no muestran correlación, tanto para YY1 (Fig. 10C) como para MDR1 (Fig. 11C).

Por otro lado, se determinó la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con LLA que han concluido la etapa de consolidación, la figura 12 muestra una microfotografía representativa de un paciente con LLA que ha concluido esta etapa, se puede observar que YY1 aumenta después de la etapa de inducción a la remisión (Fig. 12b) en comparación con lo mostrado al diagnóstico (Fig. 12a) y esta expresión se mantiene una vez que ha concluido la etapa de consolidación (Fig. 12c), esto mismo sucede con la expresión de MDR1 la cual aumenta una vez que ha concluido la etapa de inducción a la remisión (Fig. 12e) comparado con lo mostrado al diagnóstico (Fig. 12d) y esta se mantiene al término de la consolidación (Fig. 12f), mostrando una tinción principalmente nuclear para el caso de YY1 y a nivel de citoplasma y membrana para MDR1. Al graficar el porcentaje de células positivas para YY1 (Fig. 13A) y de MDR1 (Fig. 14A) al finalizar la etapa de consolidación, no existe un cambio estadísticamente significativo en esta última etapa ($p > 0.05$ t-Student para ambas proteínas), esto mismo sucede con la

intensidad de expresión de YY1 (Fig. 13B) y MDR1 (Fig. 14B) ($p>0.05$ ANOVA para ambas proteínas).

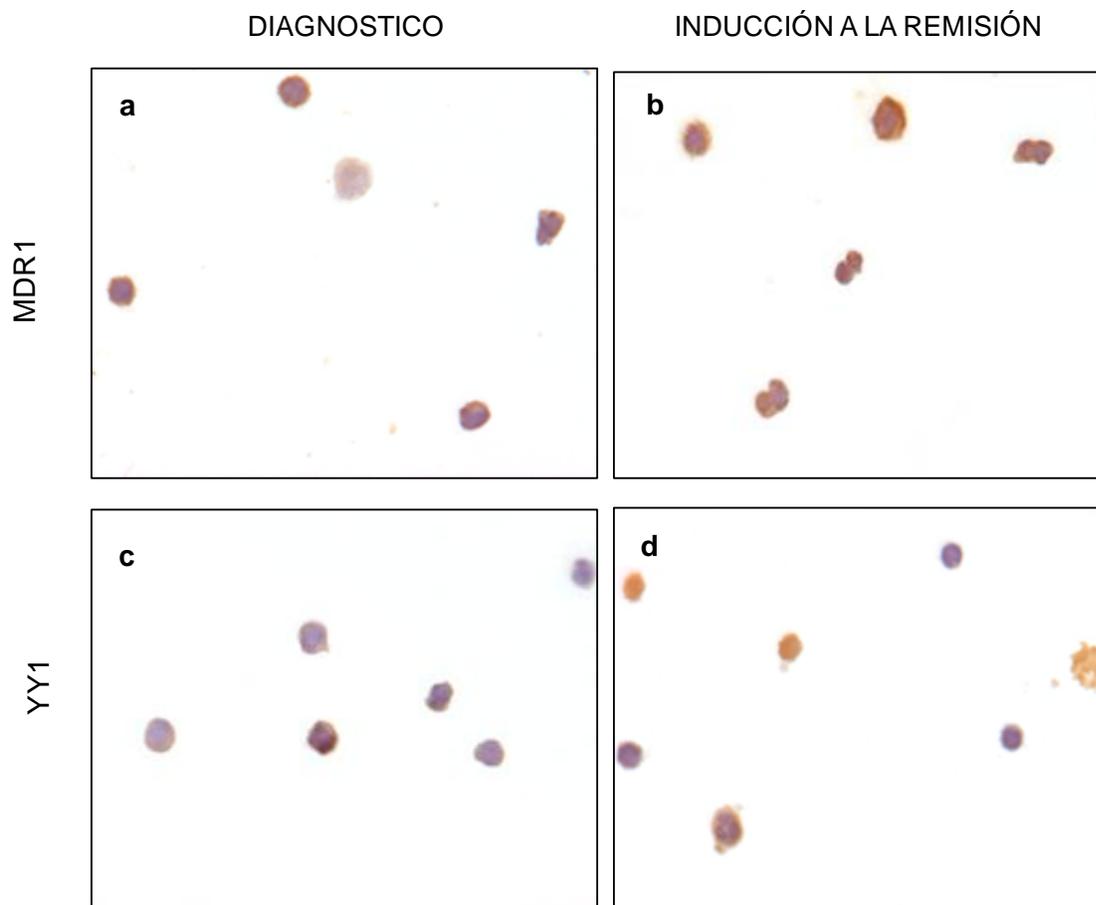


Figura 9. Microfotografía representativa de la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con LLA después de la inducción a la remisión. Se observa que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLA, tienen un aumento de la expresión de las proteínas YY1 y MDR1 al término de la inducción a la remisión (b y d) en comparación con las muestras tomadas al inicio del tratamiento (a y c). Aumento 100X.

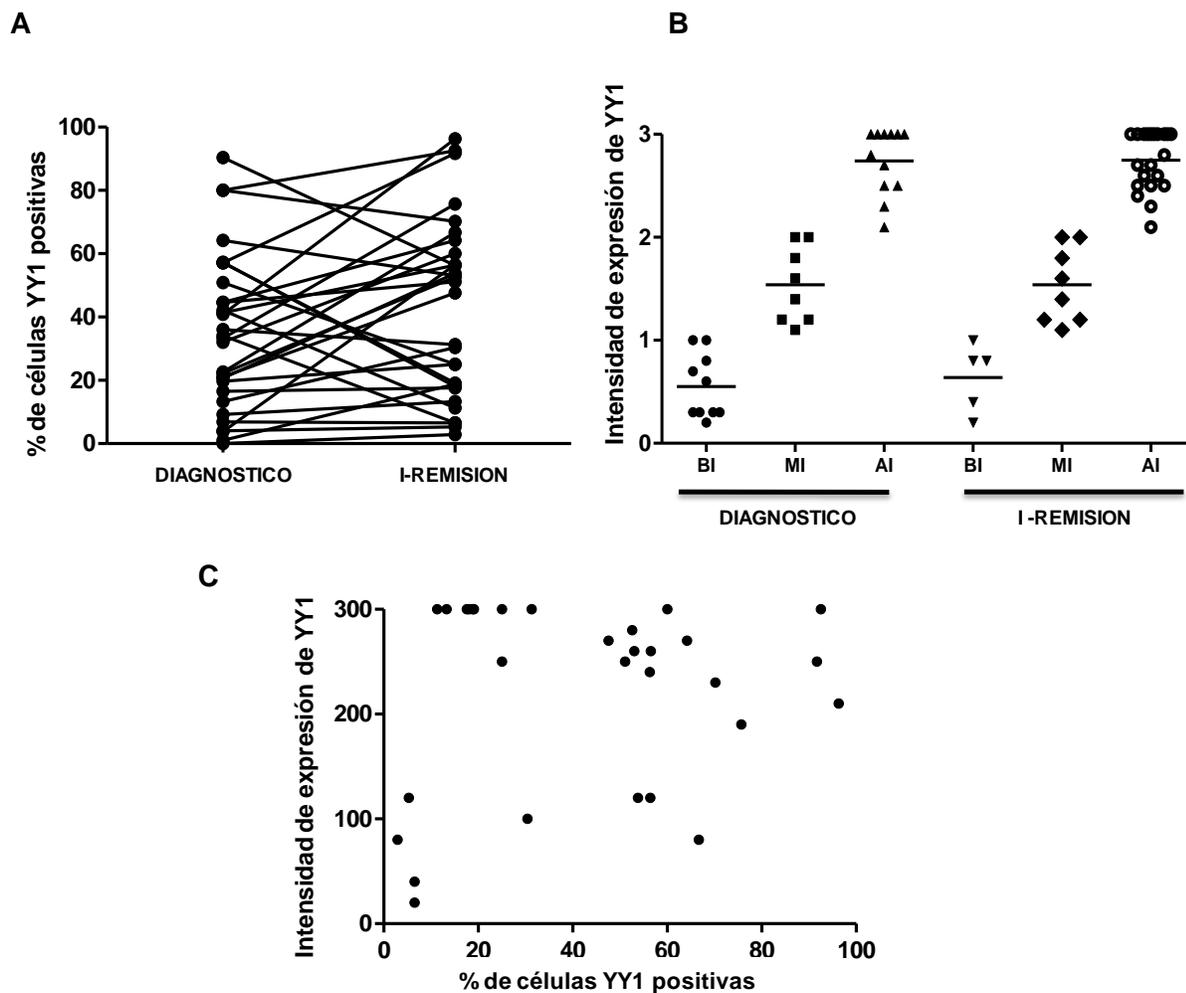


Figura 10. Evaluación de la expresión de YY1 después de la primera etapa de quimioterapia. A) Porcentaje de células YY1 positivas de pacientes con LLA después de inducción a la remisión (n=30) en comparación con las muestras tomadas al diagnóstico, se muestra que no hay diferencia en el porcentaje de células positivas para YY1 en pacientes con LLA que fueron tratados con quimioterapia ($p=0.026$ t-Student, 1ra toma vs 2da toma). **B)** Intensidad de expresión de YY1, se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no muestra diferencia con respecto a la etapa inicial de tratamiento ($p>0.05$ ANOVA). **C)** Análisis de correlación entre el porcentaje de células positivas y el grado de intensidad de expresión de YY1 no mostró correlación.

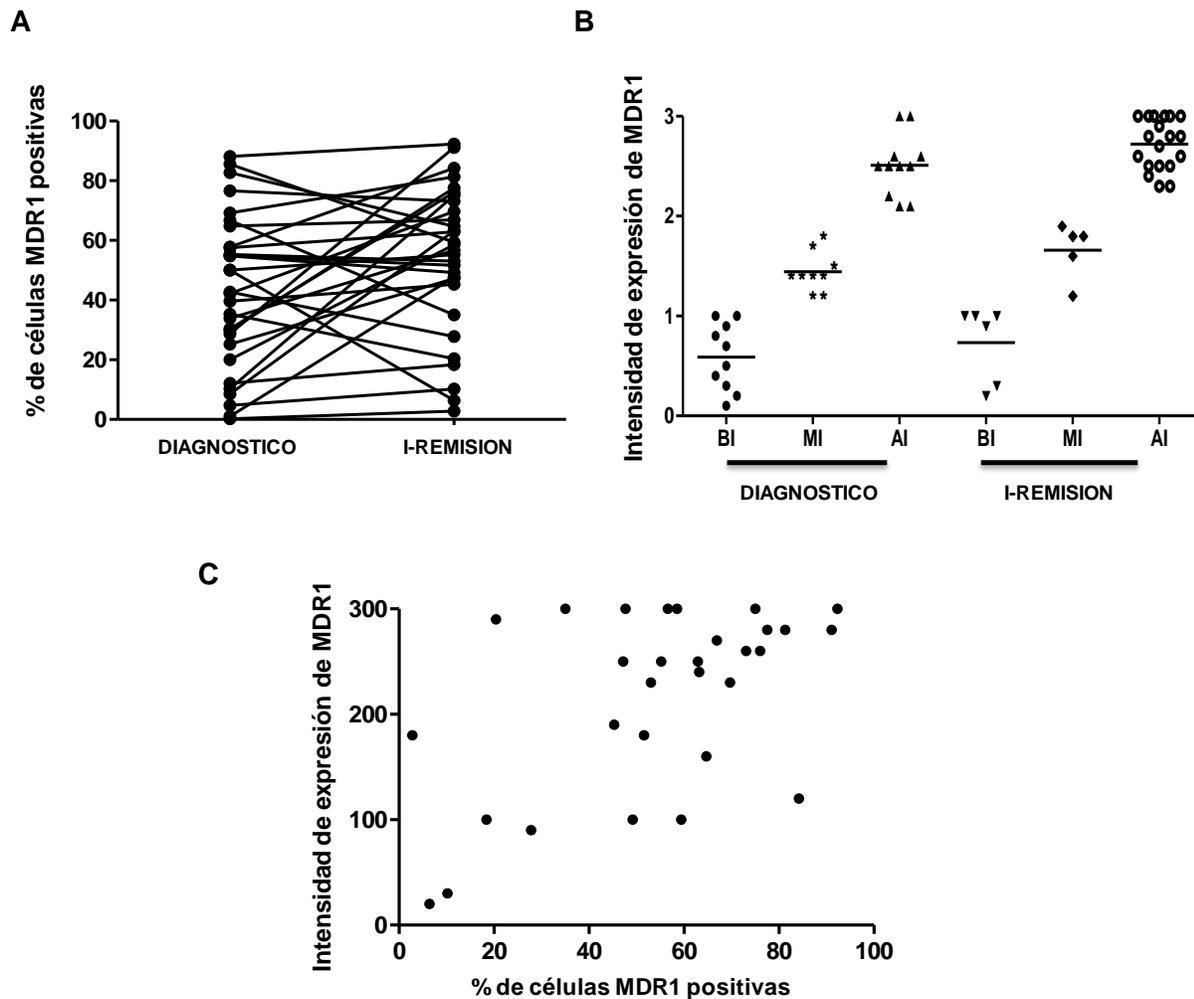


Figura 11. Evaluación de la expresión de MDR1 después de la primera etapa de quimioterapia. A) Porcentaje de células MDR1 positivas de pacientes con LLA después de la inducción a la remisión (n=30) en comparación con las muestras tomadas al diagnóstico, se muestra que no hay diferencia en el porcentaje de células positivas para YY1 en pacientes con LLA que fueron tratados con quimioterapia ($p=0.02$ t-Student). **B)** Intensidad de expresión de MDR1, se presenta una clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no muestra diferencia con respecto a la etapa inicial de tratamiento ($p>0.05$ ANOVA). **C)** Análisis de correlación entre el porcentaje de células positivas y el grado de intensidad de expresión de MDR1 no hay correlación.

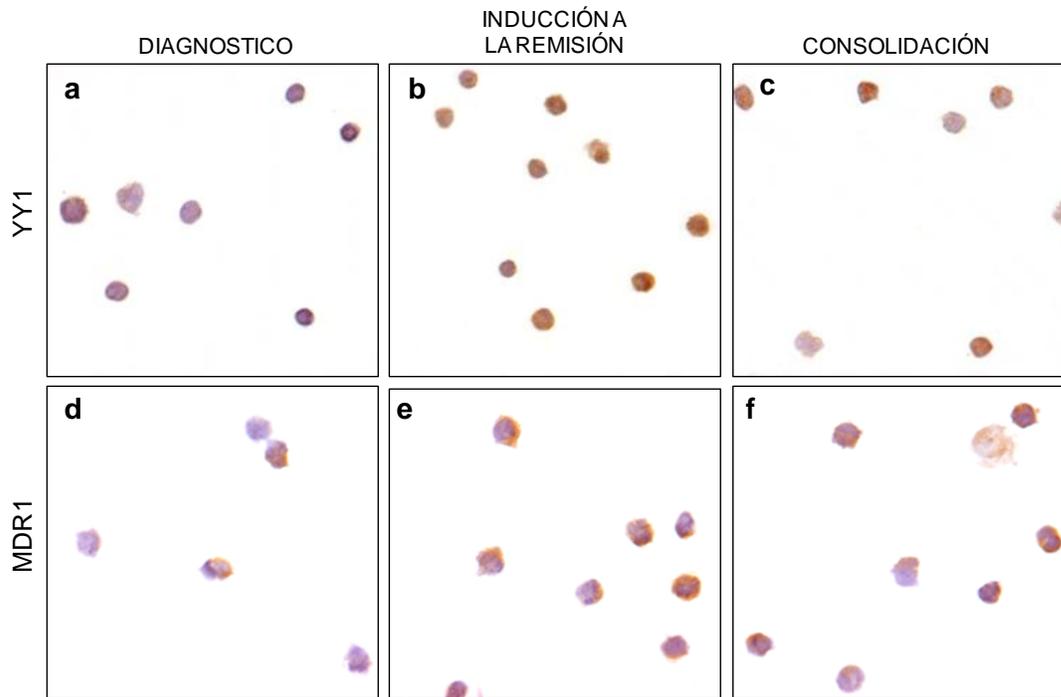


Figura 12. Microfotografía representativa de la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con LLA después de la inducción a la remisión y consolidación de quimioterapia. Se observa que las células de sangre periférica de pacientes con LLA, tienen aumento de la expresión de YY1 y MDR1 al término de la inducción a la remisión (b y e) en comparación con la expresión al diagnóstico (a y d), esta expresión se mantiene al finalizar la etapa de consolidación (c y f) del tratamiento. Aumento 100X.

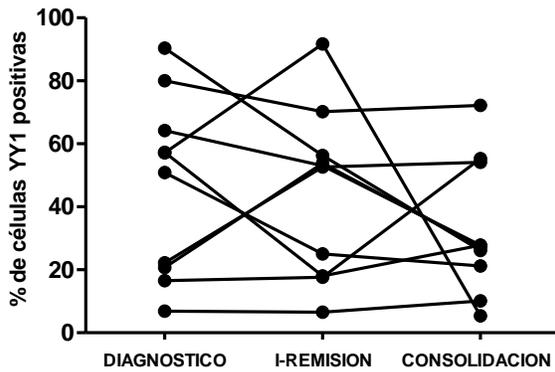
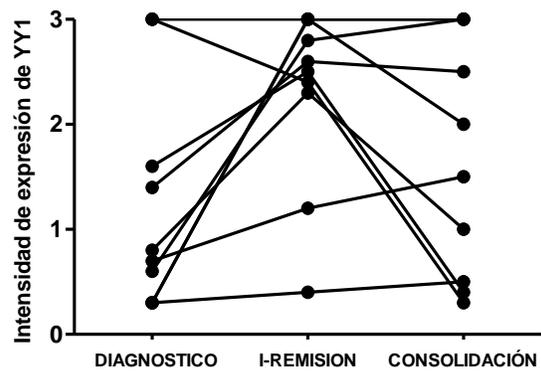
A**B**

Figura 13. Evaluación de la expresión de YY1 después de la inducción a la remisión y consolidación. A) Porcentaje de células YY1 positivas de pacientes con LLA después de inducción a la remisión y consolidación (n=10), se muestra que no hay diferencia en el porcentaje de células positivas para YY1 en pacientes con LLA que fueron tratados con quimioterapia ($p > 0.05$ t-Student). **B)** Intensidad de expresión de YY1, no hay diferencia con respecto a la etapa inicial de tratamiento ($p > 0.05$ ANOVA).

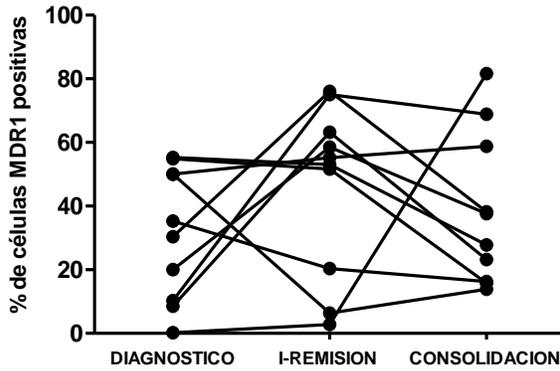
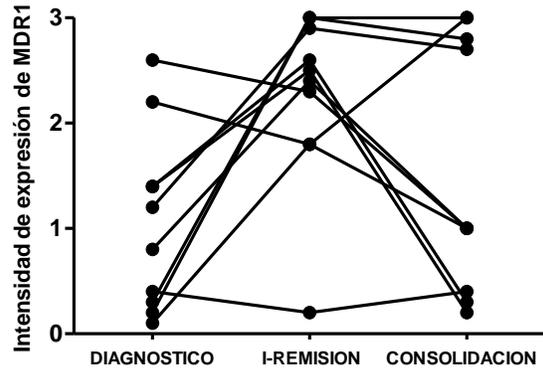
A**B**

Figura 14. Evaluación de la expresión de MDR1 después de la inducción a la remisión y consolidación. A) Porcentaje de células MDR1 positivas de pacientes con LLA después de inducción a la remisión y consolidación (n=10), se muestra que no existe una diferencia en el porcentaje de células positivas para MDR1 en pacientes con LLA que fueron tratados con quimioterapia ($p > 0.05$ t-Student). **B)** Intensidad de expresión de MDR1, no muestra diferencia con respecto a la etapa inicial de tratamiento ($p > 0.05$ ANOVA).

8.5 Asociación de la expresión de YY1 y MDR1 y el pronóstico en pacientes con LLA

Para determinar si la expresión de YY1 y de MDR1 se asocia con el grado de riesgo asignado según los datos clínicos que presenta cada paciente con LLA, los oncólogos de los dos hospitales que se incluyeron en este estudio, utilizaron criterios clínicos y sub-clínicos para clasificar a los pacientes con LLA como de bajo riesgo (también denominados de riesgo estándar) o alto riesgo, lo cual puede determinar su posible respuesta a la quimioterapia, estos parámetros se muestran en la Tabla 9. Del total de los pacientes, 23 presentaron características de bajo riesgo, lo que sugiere que pueden responder mejor a los tratamientos convencionales de quimioterapia, mientras que 65 pacientes presentaron características de alto riesgo, lo que indica que dentro de los parámetros de evaluación tienen diversos factores que predisponen a una mala respuesta a los tratamientos convencionales de quimioterapia.

Se evaluó el porcentaje de células positivas y su intensidad de expresión de YY1 y MDR1 de acuerdo al tipo de riesgo en que fueron clasificados los pacientes de bajo y alto riesgo con LLA (figura 15), se observa que en pacientes de alto riesgo hay aumento en la expresión de YY1 (Fig. 15 b) y de MDR1 (Fig. 15d) en comparación con lo mostrado por los pacientes considerados de bajo riesgo (Fig. 15 a, c respectivamente). Los resultados obtenidos de esta expresión se muestran de manera gráfica en las figuras 16 y 17, en donde se observa que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de células positivas para YY1 (Fig. 16A) y MDR1 (Fig. 17A) ($p > 0.05$, t-Student) en pacientes de bajo riesgo comparado con aquellos que son clasificados como de alto riesgo. Tampoco muestra un cambio estadísticamente significativo tanto para YY1 (Fig. 16B) como para MDR1 (Fig. 17B) en cuanto a la intensidad de la expresión ($p > 0.05$ ANOVA). Por otro lado, cabe resaltar que los pacientes que fallecieron fueron clasificados como de alto riesgo, el porcentaje de células positivas fue variado aunque la intensidad de la expresión fue clasificada como mediana intensidad y en su mayoría de alta intensidad.

Los resultados hasta ahora obtenidos nos muestran que los factores que determinan el grado de riesgo que tiene un paciente de LLA, no se asocian con la expresión de YY1 y de MDR1.

Se evaluaron de manera individual los parámetros pronóstico en relación a la expresión de YY1 y MDR1, dentro de los cuales se encuentran el número de leucocitos al diagnóstico, la edad del paciente y el fenotipo, no se encontró una relación entre estos parámetros con la expresión de las proteínas evaluadas. Por otra parte, de manera interesante se determinó si el subtipo en el que se clasifica la LLA, así como el sexo de los pacientes pudiera asociarse con el aumento en

la expresión de ambas proteínas, por lo que se evaluó el porcentaje de células positivas y su intensidad de expresión. Los resultados obtenidos según el subtipo de LLA que presentaban los pacientes, se muestran en las figuras 18 y 19, en donde se encuentran clasificados 42 pacientes con subtipo L1, 40 pacientes con el subtipo L2, y del subtipo L3 no se obtuvo ninguna muestra. Cabe señalar que a 6 de los pacientes incluidos en este estudio no se les asignó una clasificación debido a problemas técnicos que surgieron al determinar el diagnóstico en el laboratorio clínico del hospital. Se presentan en gráficas los porcentajes de células positivas para YY1 (Fig. 18A) y MDR1 (Fig. 19A) respectivamente, se observa claramente un incremento en el porcentaje de células positivas de los pacientes del subtipo L2 en comparación a los mostrados por los pacientes con subtipo L1 (YY1 $p=0.045$ LLA-L2 vs LLA-L1; MDR1 $p=0.045$ LLA-L2 vs LLA-L1 t-Student), aunque en la intensidad de expresión no se muestran cambios ($p>0.05$ ANOVA) para YY1 (Fig. 18B) y MDR1 (Fig. 19B).

Por otro lado, se evaluó la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con LLA de acuerdo al género, los resultados obtenidos se muestran en las figuras 20 y 21, en donde se observa que los pacientes con LLA del sexo masculino muestran un mayor porcentaje de células positivas con respecto a los pacientes del sexo femenino tanto para YY1 (Fig. 20A) como para MDR1 (Fig. 21A) (YY1 $p=0.034$, masculino vs femenino; MDR1 $p=0.035$, masculino vs femenino t-Student), aunque sin cambios en la intensidad de expresión de YY1 (Fig. 20B) y MDR1 (Fig. 21B) ($p>0.05$ ANOVA).

Los resultados anteriores sugieren que YY1 y MDR1 juegan un papel importante en la patogénesis de la LLA, pues niveles elevados de ambas proteínas, correlacionan con algunas características clínicas indicadoras de mal pronóstico.

Tabla 9. Características generales de los pacientes con LLA de acuerdo al riesgo

	Alto riesgo	Bajo Riesgo
n=	65	23
Género		
Femenino	33	16
Masculino	32	7
Edad	8.2 años (0.1-16)	4.8 años (1-8)
Número de células al diagnóstico /mm ³	72 953 (531-406 000)	11 353 (1190- 450 000)
Fenotipo		
Precursor B	59	19
Precursor T	12	0
Subtipo		
L1	40	
L2		42
Infiltración al Sistema Nervioso Central	5	0
No respuesta a la ventana inicial de dexametasona	5	0
Mala respuesta a la inducción a la remisión	3	0
Infiltración testicular	0	0
Recaidas	6	0
Muertes	10	0

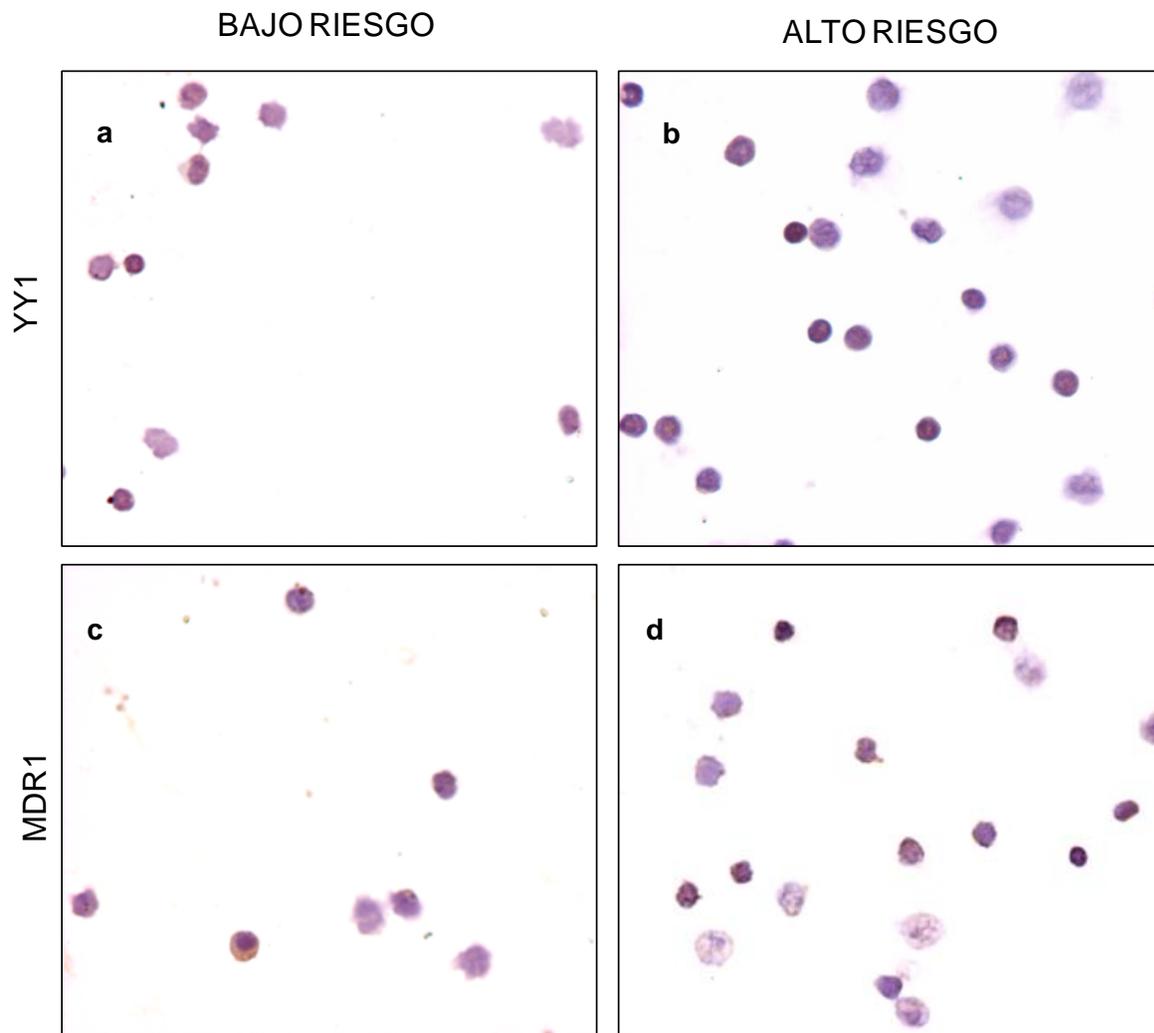


Figura 15. Microfotografía representativa de la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con LLA clasificados como de bajo riesgo y alto riesgo. Se observa que en células de sangre periférica de pacientes con LLA, se presenta un aumento en la expresión de YY1 y MDR1 en aquellos pacientes clasificados como de alto riesgo (b y d) en comparación a la expresión en un pacientes de bajo riesgo (a y c). Aumento 100X.

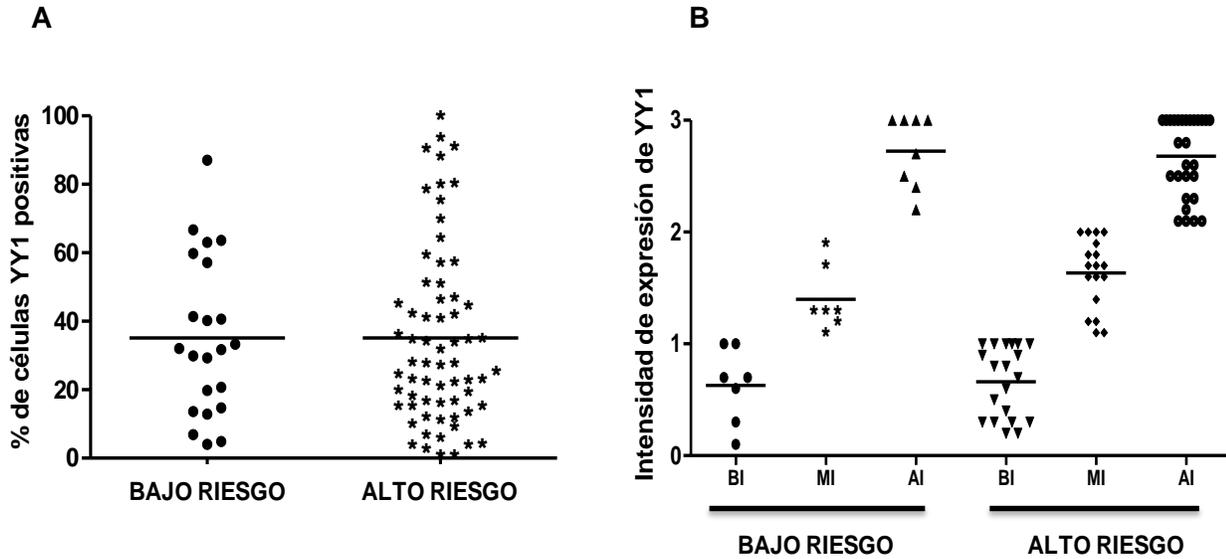


Figura 16. Evaluación de la expresión de YY1 en pacientes con LLA clasificados como de bajo y alto riesgo. A) Porcentaje de células YY1 positivas de pacientes con LLA de bajo riesgo (n= 23) y alto riesgo (n=65), no se observa diferencia ($p>0.05$ t-Student). **B)** Intensidad de expresión de YY1, en la grafica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no se observa diferencia entre los pacientes con LLA clasificados como de bajo riesgo comparado con los de alto riesgo ($p>0.05$ ANOVA)

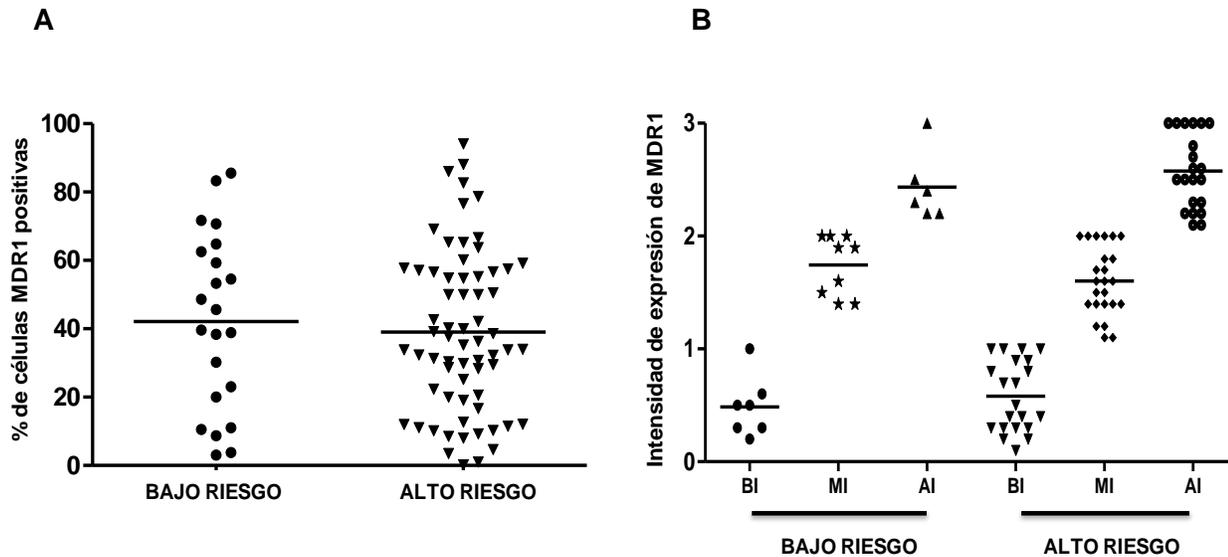


Figura 17. Evaluación de la expresión de MDR1 en pacientes con LLA clasificados como de bajo riesgo y alto riesgo. A) Porcentaje de células MDR1 positivas de pacientes con LLA de bajo riesgo (n= 23) y alto riesgo (n=65), no se observa diferencia ($p>0.05$ t-Student). **B)** Intensidad de expresión de MDR1, en la grafica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no se observa una diferencia entre los pacientes con LLA clasificados como de bajo riesgo comparado con los de alto riesgo ($p>0.05$ ANOVA)

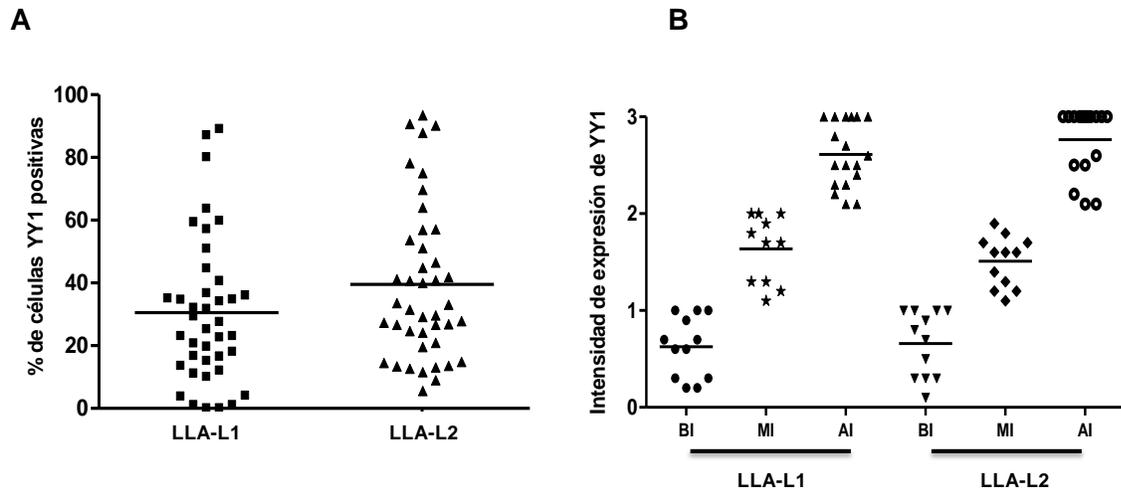


Figura 18. Cuantificación de la expresión de YY1 en pacientes con LLA y el subtipo L2. A) Porcentaje de células YY1 positivas en pacientes con LLA subtipo L2 (n=42) y subtipo L1 (n=40) muestran un aumento en la expresión en pacientes que presentan el subtipo L2 ($p = 0.045$ t-Student, LLA-L2 vs LLA-L1). **B)** Intensidad de expresión de YY1, en la grafica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión como: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no se observa diferencia en pacientes que presentan el subtipo L2 con respecto a los pacientes que presentan el subtipo L1 ($p > 0.05$ ANOVA).

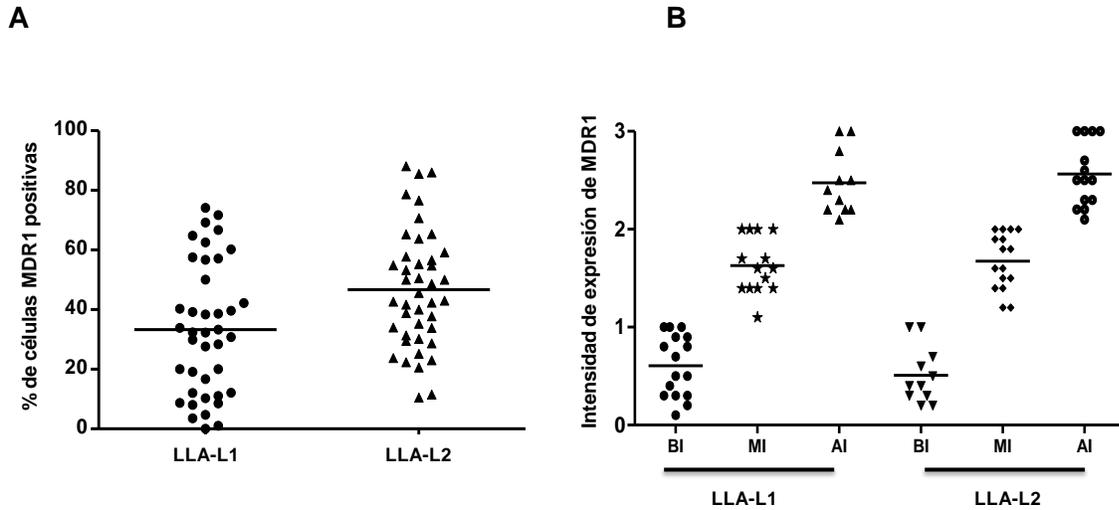


Figura 19. Cuantificación de la expresión de MDR1 en pacientes con LLA y el subtipo L2. **A)** Porcentaje de células MDR1 positivas de pacientes con LLA y subtipo L2 (n=42) y subtipo L1 (n=40) muestran aumento en la expresión en pacientes que presentan el subtipo L2 ($p = 0.003$ t-Student, LLA-L2 vs LLA-L1). **B)** Intensidad de expresión de MDR1, en la gráfica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión como: Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no se observa diferencia en pacientes que presentan el subtipo L2 con respecto a los pacientes que presentan el subtipo L1 ($p > 0.05$ ANOVA)

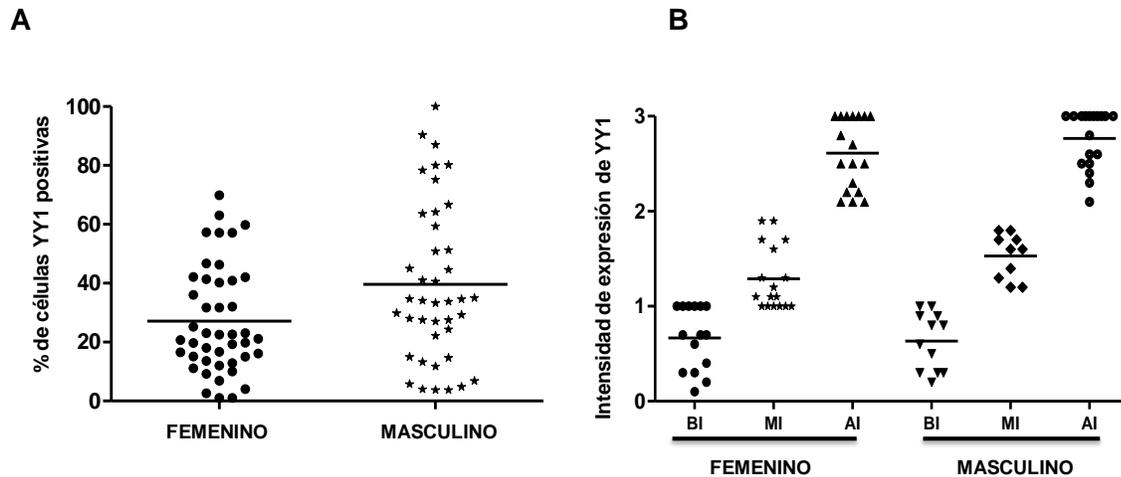


Figura 20. Cuantificación de la expresión de YY1 en pacientes con LLA del género masculino. **A)** Porcentaje de células YY1, positivas de pacientes con LLA del género masculino (n=39) y femenino (n=49), se muestra un aumento en pacientes de género masculino ($p=0.034$, t-Student, masculino vs femenino). **B)** Intensidad de expresión de YY1, en la grafica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión; Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no se observa diferencia en intensidad de expresión entre pacientes de género masculino con respecto a los de género femenino ($p>0.05$ ANOVA)

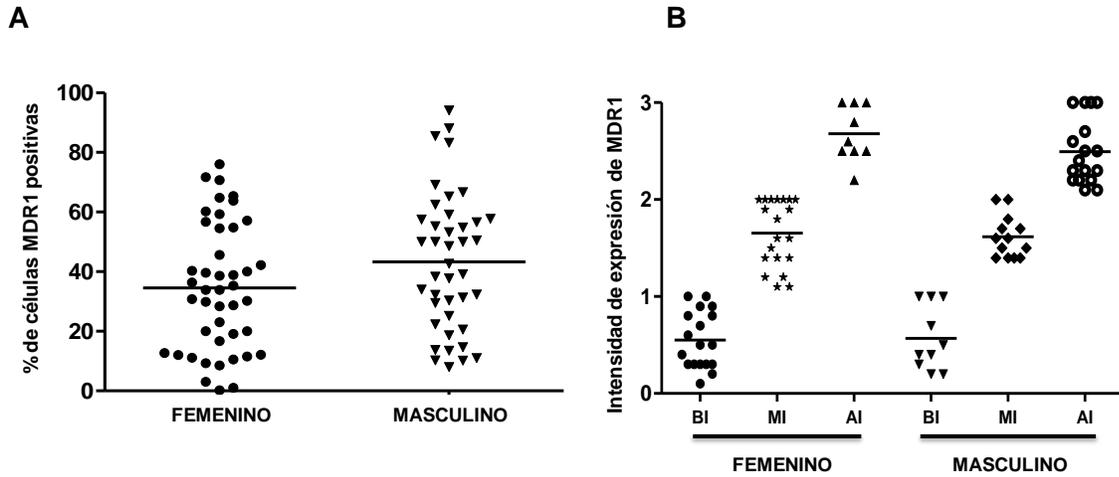


Figura 21. Cuantificación de la expresión de MDR1 en pacientes con LLA del género masculino. **A)** Porcentaje de células MDR1 positivas de pacientes con LLA del género masculino (n=39) y femenino (n=49), se muestra aumento en pacientes de género masculino ($p=0.035$, t-Student, masculino vs femenino). **B)** Intensidad de expresión de MDR1, en la grafica se presenta la clasificación de acuerdo a la intensidad de expresión; Baja Intensidad (BI), Mediana Intensidad (MI) y Alta Intensidad (AI), no se observa diferencia en la intensidad de expresión en pacientes de género masculino con respecto a los del género femenino ($p>0.05$ ANOVA)

10. DISCUSIÓN

El cáncer en niños representa la segunda causa de muerte en México, aproximadamente el 35% corresponden a leucemias agudas, de las cuales la LLA representa el mayor número de casos. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se atienden alrededor de 80 nuevos casos de LLA al año ⁷, aún cuando los esquemas actuales de tratamiento en esta neoplasia han aumentado la supervivencia de los pacientes, la eficacia de la quimioterapia se ve limitada por los mecanismos de resistencia que las células adquieren para revertir la acción de los fármacos ²⁰.

Se determinó que uno de los principales factores que conllevan a la quimiorresistencia, es la sobreexpresión de proteínas de membrana celular, encargadas de la expulsión de agentes citotóxicos, dentro de las cuales destaca la proteína de multiresistencia a drogas 1 también llamada MDR1, debido a esto, diversas investigaciones se han enfocado a explicar el mecanismo por el cual la actividad de esta proteína puede ser modificada en diferentes tipos de cáncer, así como los mecanismos para revertir su actividad ^{18,20}. Todos estos estudios han arrojado diversos mecanismos de regulación que involucran a diferentes proteínas cuya participación no ha sido completamente dilucidada.

Se sabe que MDR1 es regulado por diversos factores de transcripción, en un estudio realizado por Comerford y cols. en el 2002, se demostró mediante ensayos de plásmidos reporteros y mutación sitio dirigida de las secuencias de unión del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) en el promotor del gen *mdr1*, así como ensayos de RNA de interferencia, que HIF-1 regula positivamente la transcripción de *mdr1* en líneas celulares de adenocarcinoma ³⁵. De la misma manera Fujita y cols., en el 2005, determinaron que la proteína de unión Y-box 1 (YB-1) en cáncer de mama regula la expresión de MDR1 en respuesta a plaquitalxel debido a que este factor de transcripción se une a su región promotora ²², otros factores como FOXO3a participan en su regulación transcripcional de MDR1 en líneas celulares de cáncer gástrico y leucemia ²³. En un estudio reciente se demostró que STAT3 puede unirse a la región promotora de *mdr1* y modular su transcripción ²⁶. También se ha estudiado la regulación negativa de esta proteína, en 1997, Thottassery y cols., demostraron que p53 juega un papel muy importante al inhibir la actividad de este factor de transcripción, la expresión de MDR1 se ve aumentada ³⁶. Por otro lado, se ha estudiado el papel de los micro-RNAs en la regulación transcripcional de *mdr1*, Zhao y cols., en el 2010, determinaron que miR-138 regula la expresión de este gen de manera negativa ²⁵. Sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento acerca de la regulación transcripcional de este gen por otros factores de transcripción implicados en carcinogénesis.

La existencia de algoritmos que nos permiten predecir si una secuencia promotora tiene sitios consenso de unión a factores de transcripción específicos, ha sido de gran utilidad para determinar los posibles mecanismos de regulación transcripcional. Esta herramienta nos permite establecer que el promotor del gen de *mdr1* presenta 4 sitios de unión para el factor de transcripción YY1. Se sabe que este factor de transcripción regula múltiples procesos biológicos, por ejemplo, mecanismos de resistencia a apoptosis, pues regula negativamente receptores de muerte como FAS y DR5 en diferentes tipos de cáncer entre los que se encuentran próstata y ovario ^{29,32}. Por lo que es razonable pensar que pudiera participar en la regulación transcripcional del gen de *mdr1*, y por tanto estar implicado en los mecanismos que conllevan a una mala respuesta a los tratamientos quimioterapéuticos en la LLA. En nuestro estudio los resultados de plásmidos reporteros (Fig. 3) y ChiP (Fig. 4) demuestran que YY1 se une a la región promotora de *mdr1* y regula su expresión transcripcional de manera positiva. Lo anterior es de gran relevancia, debido a que en los últimos años YY1 ha sido vinculado con diversos mecanismos que impiden la muerte de células tumorales, principalmente por la inhibición de los procesos de apoptosis. Los hallazgos presentados en este trabajo, muestran un nuevo mecanismo por el que YY1 está implicado en la supervivencia de las células tumorales, independiente de la apoptosis. Por otro lado, resulta de gran importancia el conocer que YY1 también regula la expresión de MDR1, la cual, es una de las principales proteínas implicadas en la falla al tratamiento quimioterapéutico.

Para demostrar si la regulación de MDR1 por YY1 pudiera tener un impacto biológico en la LLA pediátrica, evaluamos la expresión de ambas proteínas en muestras de pacientes con esta enfermedad vírgenes al tratamiento y después de las diferentes etapas de la quimioterapia. En lo que respecta a la expresión de MDR1, ésta ha sido ampliamente evaluada en diversos tipos de cáncer desde hace algunas décadas, por ejemplo en 1990, Noonan y cols., realizaron el análisis de la expresión de esta proteína en tejido humano normal, comparado con tejido tumoral de múltiples tipos de cáncer (incluyendo colon, pulmón, ovario, osteosarcoma y linfoma), así como en diversas líneas celulares tumorales (incluyendo vejiga, pulmón y leucemia), encontrando un aumento de MDR1 en tejido y líneas celulares tumorales ³⁷. Goasguen y cols., en 1993, realizaron un estudio en el que evaluaron la expresión de MDR1 como posible marcador pronóstico en pacientes con LLA en niños y adultos. Encontraron que en pacientes que expresaron menor cantidad MDR1 al diagnóstico, también presentaron menor recaída y una tasa de supervivencia más elevada ³⁸.

Los resultados de la expresión de MDR1 obtenidos en el presente trabajo, corroboran los estudios arriba mencionados. Se encontró en 88 muestras de pacientes con LLA pediátrica que la expresión de esta proteína se encuentra aumentada de manera significativa en comparación con individuos control. Sin embargo, los resultados de la expresión de YY1 en estos mismos pacientes, demostraron por primera vez que este factor de transcripción también se encuentra aumentado. Además, la expresión de YY1 y MDR1 correlaciona positivamente, lo cual sugiere la participación de este factor de transcripción en la patogénesis de la LLA. Los resultados de expresión de ambas proteínas y su correlación positiva en pacientes con LLA también corroboran los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, donde se muestra que YY1 participa en la regulación de la expresión de MDR1.

Diversos estudios, principalmente *in vitro*, han demostrado que células leucémicas al ser tratadas con fármacos como doxorrubicina (fármaco empleado en el tratamiento contra LLA), inducen una sobreexpresión de MDR1 que conlleva a un fenotipo quimiorresistente^{23,26}, nuestros resultados validan lo anterior, ya que encontramos que algunos de los pacientes con LLA que recibieron la primera etapa de quimioterapia (inducción a la remisión), presentan un aumento significativo de la expresión de MDR1 principalmente a nivel de membrana (Fig. 9b) en donde se sabe lleva a cabo su función como bomba expulsora de agentes citotóxicos, como es el caso de los fármacos utilizados en los esquemas de tratamiento. En este estudio también se demuestra por primera vez que las drogas quimioterapéuticas, al igual que MDR1, inducen un incremento en la expresión de YY1 en algunos pacientes con LLA, la expresión de esta proteína se encuentra principalmente a nivel nuclear (Fig. 9c), en donde se sabe lleva a cabo su función transcripcional. Cabe señalar que el análisis individual de la expresión de ambas proteínas en los pacientes con LLA antes y después del tratamiento muestra que se comportan de la misma manera, es decir cuando MDR1 se encuentra aumentado, también encontramos aumentada la expresión de YY1 y viceversa. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, esto muy probablemente se deba al tamaño de la muestra (inducción a la remisión n=30 y consolidación n=10).

De manera interesante en nuestro grupo de estudio, se presentaron 10 defunciones, en estos pacientes encontramos de manera general niveles muy altos de expresión tanto de YY1, como de MDR1, los cuales al no responder a la quimioterapia presentaron subsecuentes recaídas que los llevaron a la muerte.

Diversos estudios han logrado correlacionar la expresión de MDR1 con factores de riesgo en la LLA, los cuales son determinados con base en características clínicas, de laboratorio y

moleculares. Se ha encontrado que la expresión de MDR1 al diagnóstico, en pacientes con esta enfermedad, puede contribuir a la clasificación temprana y más adecuada del tipo de riesgo y la posible falla al tratamiento³⁹. Sin embargo, no existen estudios que señalen que la expresión de YY1 pudiese tener la misma función en dicha clasificación. En el presente estudio, encontramos que la expresión elevada de YY1 se asocia con algunos factores de alto riesgo como son el género y el subtipo morfológico L2 de LLA. Esto sugiere que la expresión de YY1 puede determinar el tipo de riesgo (bajo riesgo o alto riesgo) en pacientes con esta enfermedad y por tanto, su respuesta al tratamiento quimioterapéutico. Consideramos que no se encontró correlación con otros factores de riesgo, debido a que nuestro sistema de salud pública, no permite una adecuada clasificación de los pacientes, por lo que posiblemente algunos de ellos no fueron bien clasificados desde el principio y no permitió que se realizaran correlaciones apropiadas. Por otro lado, observamos que en el grupo de pacientes de alto riesgo la expresión de YY1 como de MDR1 se encontró más elevado en aquellos que no respondieron a la quimioterapia y que finalmente fallecieron, por lo que en un futuro podríamos concluir de manera contundente su valor pronóstico al analizar la evolución clínica de los pacientes incluidos en este estudio.

Es muy importante señalar que los estudios de expresión de MDR1 y YY1 se llevaron a cabo en células purificadas de sangre periférica, con resultados muy alentadores, que indican que estas proteínas pueden ser candidatos excelentes como marcadores pronóstico. Lo cual resulta atractivo ya que se trata de un procedimiento de toma de muestra mucho menos invasivo que el caso de muestras de médula ósea. Sin embargo, consideramos que estudios adicionales en muestras de médula ósea, acerca de la expresión de MDR1 y YY1 se requieren, para poder comparar su valor pronóstico.

Los resultados generados en este estudio son de gran relevancia, debido a que como ya se mencionó, nuestro sistema de salud pública, no permite una adecuada clasificación de los pacientes y por tanto, determinar su posible respuesta a los tratamientos. Por lo que la opción de utilizar la expresión de YY1 y MDR1 como marcadores pronósticos, proporcionará al clínico una herramienta de fácil acceso para una correcta clasificación de los pacientes con LLA y por tanto, un tratamiento mejor dirigido.

Aún cuando existen diversos estudios que denotan la participación de múltiples factores de transcripción en la regulación de *mdr1*, nuestra investigación representa el primer reporte acerca de la regulación transcripcional del gen *mdr1* por YY1, y que muy probablemente esta regulación tenga un efecto biológico en los pacientes pediátricos con LLA, impactando en la

respuesta al tratamiento quimioterápico, lo cual sugiere que MDR1 y YY1 se perfilan como buenos factores pronósticos y/o blancos terapéuticos.

10. CONCLUSIONES

- YY1 interactúa con la región promotora del gen de *mdr1*, y participa en la regulación transcripcional de este gen.
- La expresión de YY1 en CMN de sangre periférica aumenta en pacientes pediátricos con LLA, y su correlación directamente proporcional con la expresión de MDR1.
- Los factores de riesgo que determinan la posible respuesta al tratamiento quimioterapéutico en la LLA, como el subtipo y el género, podrían determinar el grado de expresión de YY1 y MDR1.
- La expresión de MDR1 y YY1 en sangre periférica pudieran ser potenciales factores pronósticos y/o blancos terapéuticos en la LLA.

11. REFERENCIAS

- (1) Organización Mundial de la Salud. ¿Aumenta o disminuye el número de casos de cáncer en el mundo? 2008. <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html>
- (2) Instituto Nacional del Cáncer. Información general sobre la leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil. 2011. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/LLAinfantil/HealthProfessional/page1>
- (3) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas a propósito del día mundial del Cáncer. 2011. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>
- (4) Sistema Nacional de Información en Salud. Mortalidad en México. 2009. http://www.sep.gob.mx/work/models/sep1/Resource/1707/1/images/informe_coia.pdf
- (5) Medina-Sanson, A. Pediatric oncology at Hospital Infantil de México: fifty-five years of accomplishment. *Pediatr Hematol Oncol* 19. 2002.
- (6) Perez-Saldivar, M. L.; Fajardo-Gutierrez, A.; Bernaldez-Rios, R.; Martinez-Avalos, A.; Medina-Sanson, A.; Espinosa-Hernandez, L.; Flores-Chapa, J. D.; Amador-Sanchez, R.; Penaloza-Gonzalez, J. G.; Alvarez-Rodriguez, F. J.; Bolea-Murga, V.; Flores-Lujano, J.; Rodriguez-Zepeda, M. C.; Rivera-Luna, R.; Dorantes-Acosta, E. M.; Jimenez-Hernandez, E.; Alvarado-Ibarra, M.; Velazquez-Avina, M. M.; Torres-Nava, J. R.; Duarte-Rodriguez, D. A.; Paredes-Aguilera, R.; Del Campo-Martinez, M. L.; Cardenas-Cardos, R.; Alamilla-Galicia, P. H.; Bekker-Mendez, V. C.; Ortega-Alvarez, M. C.; Mejia-Arangure, J. M. Childhood Acute Leukemias Are Frequent in Mexico City: Descriptive Epidemiology. *BMC. Cancer* **2011**, *11*, 355.
- (7) Castillo-Martínez C. Calidad de vida en niños con leucemia linfoblástica aguda durante la inducción a la remisión mediante el PedsQL Cancer Module. Aurora Medina-Sansón and Marta Zapata-Tarrés. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 66. **2009**.
- (8) Onciu, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2009**, *23*, 655-674.
- (9) Nidus Information Services. Leukemia, Acute Lymphoblastic Annual Report. 86, 1-12. **2005**.
- (10) McLean, T. W.; Ringold, S.; Neuberg, D.; Stegmaier, K.; Tantravahi, R.; Ritz, J.; Koeffler, H. P.; Takeuchi, S.; Janssen, J. W.; Seriu, T.; Bartram, C. R.; Sallan, S. E.; Gilliland, D. G.; Golub, T. R. TEL/AML-1 Dimerizes and Is Associated With a Favorable Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **1996**, *88*, 4252-4258.
- (11) Chessells, J. M.; Harrison, G.; Richards, S. M.; Bailey, C. C.; Hill, F. G.; Gibson, B. E.; Hann, I. M. Down's Syndrome and Acute Lymphoblastic Leukaemia: Clinical Features and Response to Treatment. *Arch. Dis. Child* **2001**, *85*, 321-325.

- (12) Bennett, J. M.; Catovsky, D.; Daniel, M. T.; Flandrin, G.; Galton, D. A.; Gralnick, H. R.; Sultan, C. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB) Co-Operative Group. *Br. J. Haematol.* **1976**, *33*, 451-458.
- (13) Ortega Sánchez M A; Osnaya Ortega M L; Rosas Barrientos J V. Leucemia Linfoblástica Aguda. *Medicina Interna de México* **2007**, *23*, 26-33. enero-febrero.
- (14) Lassaletta Atienza A. Leucemias; Leucemia Linfoblástica Aguda. *Pediatría integral* **2004**, *5*, 435-442.
- (15) Pui, C. H.; Sandlund, J. T.; Pei, D.; Campana, D.; Rivera, G. K.; Ribeiro, R. C.; Rubnitz, J. E.; Razzouk, B. I.; Howard, S. C.; Hudson, M. M.; Cheng, C.; Kun, L. E.; Raimondi, S. C.; Behm, F. G.; Downing, J. R.; Relling, M. V.; Evans, W. E. Improved Outcome for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood* **2004**, *104*, 2690-2696.
- (16) Paredes-Aguilera, R. Leucemias agudas en niños. *Gaceta Médica de México* **2003**, *139*, 113-118.
- (17) Higgins, C. F. Multiple Molecular Mechanisms for Multidrug Resistance Transporters. *Nature* **2007**, *446*, 749-757.
- (18) Ambudkar, S. V.; Kimchi-Sarfaty, C.; Sauna, Z. E.; Gottesman, M. M. P-Glycoprotein: From Genomics to Mechanism. *Oncogene* **2003**, *22*, 7468-7485.
- (19) Bodor, M.; Kelly, E. J.; Ho, R. J. Characterization of the Human MDR1 Gene. *AAPS. J.* **2005**, *7*, E1-E5.
- (20) Ueda, K. [Multidrug Resistance of Cancer Cells Mediated by ABC Superfamily Transporters]. *Nihon Rinsho* **1997**, *55*, 1024-1029.
- (21) Ruíz Gómez M J; Souviron Rodríguez A; Martínez Morillo M. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *Anales de Medicina Interna* **2002**, *19*, 477-485.
- (22) Fujita, T.; Ito, K.; Izumi, H.; Kimura, M.; Sano, M.; Nakagomi, H.; Maeno, K.; Hama, Y.; Shingu, K.; Tsuchiya, S.; Kohno, K.; Fujimori, M. Increased Nuclear Localization of Transcription Factor Y-Box Binding Protein 1 Accompanied by Up-Regulation of P-Glycoprotein in Breast Cancer Pretreated With Paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 8837-8844.
- (23) Hui, R. C.; Francis, R. E.; Guest, S. K.; Costa, J. R.; Gomes, A. R.; Myatt, S. S.; Brosens, J. J.; Lam, E. W. Doxorubicin Activates FOXO3a to Induce the Expression of Multidrug Resistance Gene ABCB1 (MDR1) in K562 Leukemic Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 670-678.
- (24) Seo, S. B.; Hur, J. G.; Kim, M. J.; Lee, J. W.; Kim, H. B.; Bae, J. H.; Kim, D. W.; Kang, C. D.; Kim, S. H. TRAIL Sensitize MDR Cells to MDR-Related Drugs by Down-Regulation of P-Glycoprotein Through Inhibition of DNA-PKcs/Akt/GSK-3beta Pathway and Activation of Caspases. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 199.

- (25) Zhao, X.; Yang, L.; Hu, J.; Ruan, J. MiR-138 Might Reverse Multidrug Resistance of Leukemia Cells. *Leuk. Res.* **2010**, *34*, 1078-1082.
- (26) Zhang, X.; Xiao, W.; Wang, L.; Tian, Z.; Zhang, J. Deactivation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Reverses Chemotherapeutics Resistance of Leukemia Cells Via Down-Regulating P-Gp. *PLoS. One.* **2011**, *6*, e20965.
- (27) Gordon, S.; Akopyan, G.; Garban, H.; Bonavida, B. Transcription Factor YY1: Structure, Function, and Therapeutic Implications in Cancer Biology. *Oncogene* **2006**, *25*, 1125-1142.
- (28) Sui, G.; Affar, e. B.; Shi, Y.; Brignone, C.; Wall, N. R.; Yin, P.; Donohoe, M.; Luke, M. P.; Calvo, D.; Grossman, S. R.; Shi, Y. Yin Yang 1 Is a Negative Regulator of P53. *Cell* **2004**, *117*, 859-872.
- (29) Baritaki, S.; Huerta-Yepez, S.; Sakai, T.; Spandidos, D. A.; Bonavida, B. Chemotherapeutic Drugs Sensitize Cancer Cells to TRAIL-Mediated Apoptosis: Up-Regulation of DR5 and Inhibition of Yin Yang 1. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 1387-1399.
- (30) Huerta-Yepez, S.; Vega, M.; Garban, H.; Bonavida, B. Involvement of the TNF-Alpha Autocrine-Paracrine Loop, Via NF-KappaB and YY1, in the Regulation of Tumor Cell Resistance to Fas-Induced Apoptosis. *Clin. Immunol.* **2006**, *120*, 297-309.
- (31) Garban, H. J.; Bonavida, B. Nitric Oxide Inhibits the Transcription Repressor Yin-Yang 1 Binding Activity at the Silencer Region of the Fas Promoter: a Pivotal Role for Nitric Oxide in the Up-Regulation of Fas Gene Expression in Human Tumor Cells. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 75-81.
- (32) Huerta-Yepez, S.; Vega, M.; Escoto-Chavez, S. E.; Murdock, B.; Sakai, T.; Baritaki, S.; Bonavida, B. Nitric Oxide Sensitizes Tumor Cells to TRAIL-Induced Apoptosis Via Inhibition of the DR5 Transcription Repressor Yin Yang 1. *Nitric. Oxide.* **2009**, *20*, 39-52.
- (33) Seligson, D.; Horvath, S.; Huerta-Yepez, S.; Hanna, S.; Garban, H.; Roberts, A.; Shi, T.; Liu, X.; Chia, D.; Goodglick, L.; Bonavida, B. Expression of Transcription Factor Yin Yang 1 in Prostate Cancer. *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 131-141.
- (34) Liu, H.; Schmidt-Supprian, M.; Shi, Y.; Hobeika, E.; Barteneva, N.; Jumaa, H.; Pelanda, R.; Reth, M.; Skok, J.; Rajewsky, K.; Shi, Y. Yin Yang 1 Is a Critical Regulator of B-Cell Development. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1179-1189.
- (35) Comerford, K. M.; Wallace, T. J.; Karhausen, J.; Louis, N. A.; Montalto, M. C.; Colgan, S. P. Hypoxia-Inducible Factor-1-Dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3387-3394.
- (36) Thottassery, J. V.; Zambetti, G. P.; Arimori, K.; Schuetz, E. G.; Schuetz, J. D. P53-Dependent Regulation of MDR1 Gene Expression Causes Selective Resistance to Chemotherapeutic Agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1997**, *94*, 11037-11042.
- (37) Noonan, K. E.; Beck, C.; Holzmayer, T. A.; Chin, J. E.; Wunder, J. S.; Andrulis, I. L.; Gazdar, A. F.; Willman, C. L.; Griffith, B.; Von Hoff, D. D.; . Quantitative Analysis of MDR1 (Multidrug Resistance) Gene Expression in Human Tumors by Polymerase Chain Reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1990**, *87*, 7160-7164.

- (38) Goasguen, J. E.; Dossot, J. M.; Fardel, O.; Le, M. F.; Le, G. E.; Leblay, R.; LePrise, P. Y.; Chaperon, J.; Fauchet, R. Expression of the Multidrug Resistance-Associated P-Glycoprotein (P-170) in 59 Cases of De Novo Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Implications. *Blood* **1993**, *81*, 2394-2398.
- (39) Kourti, M.; Vavatsi, N.; Gombakis, N.; Sidi, V.; Tzimagiorgis, G.; Papageorgiou, T.; Kolioukas, D.; Athanassiadou, F. Expression of Multidrug Resistance 1 (MDR1), Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP1), Lung Resistance Protein (LRP), and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Genes and Clinical Outcome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int. J. Hematol.* **2007**, *86*, 166-173.