



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Instituto de Fisiología

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas

Tesis Profesional:

“Evaluación de la reversión de la resistencia a la quimioterapia en células tumorales mediante el empleo de una molécula pequeña con capacidad potencial de inhibir la actividad del factor de transcripción Yin-Yang 1”

Tesis para obtener el título de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Mariana Hernández Cervantes

Directora de Tesis:

D. en C. Tania Valentina López Pérez

Heroica Puebla de Zaragoza, Agosto 2021

CONTENIDO

ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Generalidades del cáncer	2
El cáncer infantil	3
Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	3
Diagnóstico y tratamiento de la LLA	6
ANTECEDENTES	8
ANTECEDENTES GENERALES	8
Quimioresistencia en Leucemia Linfoblástica Aguda	8
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	10
Factor de transcripción Yin-Yang 1 en cáncer	10
Moléculas pequeñas como alternativas de tratamiento clínico	15
Planteamiento del problema	17
OBJETIVOS	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
Cultivo Celular	20
Ensayos dosis-respuesta	20
Análisis del efecto del Inh-YY1 en la transcripción	20
Ensayo de Inmunocitoquímica (ICQ)	21
Inducción de apoptosis	21
Ensayo de TUNEL (Transferase dUTP nick end labeling) in situ	22
Detección de caspasa 3 activa por citometría de flujo	23
Análisis de datos	23
RESULTADOS	24
YY1 se encuentra sobreexpresado en LLA	24
El etopósido es tóxico en células CCRF-SB en dosis micromolares	25
En dosis bajas el Inh-YY1 no daña significativamente la viabilidad celular	26

El Inh-YY1 regula negativamente la actividad de YY1 impactando en la expresión de sus genes blancos MDR1 Y Fas.....	27
El Inh-YY1 sensibiliza a células de LLA a etopósido.....	29
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

ABREVIATURAS.

ABC	Familia de proteínas casete de unión adenosin trifosfato ATP
ACS	Sociedad Americana contra el Cáncer
BFM	Berlín-Frankfurt-Münster
CDDP	Cis-diaminodicloroplatino II o Cisplatino
DAB	Diaminobencidina
DR5	Receptor de muerte 5
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética
ETO	Etopósido
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico
Fas	Receptor de antígeno de apoptosis 1
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
HSP	Proteínas de choque térmico
IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
ICQ	Inmunocitoquímica
Inh-YY1	Inhibidor Yin Yang 1
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda Fenotipo B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda Fenotipo T
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
mAbs	Anticuerpos Monoclonales
<i>mdr1</i>	Gen que codifica la proteína de multirresistencia a drogas

MDR1	Proteína de Multirresistencia a Drogas
MMP	Metaloproteinasas de Matriz
MO	Médula Ósea
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
PPP2CA	Subunidad catalítica alfa de la proteína Fosfatasa 2
PTEN	Proteína homóloga de la fosfatasa y la tensina
qRT-PCR	PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real
RCNA	Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes
SFB	Suero Fetal Bovino
SMeO	Sociedad Mexicana de Oncología
SNAIL	Proteína de dedo de Zinc
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TM	Dominios Transmembrana
TUNEL	Test de fragmentación de ADN
YY1	Yin Yang 1

RESUMEN.

Introducción. En México la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es uno de los tipos más comunes de cáncer que se desarrollan entre niños y adolescentes, cerca del 10 al 30% de los pacientes no sobreviven a causa de una mala respuesta al tratamiento convencional. Las moléculas pequeñas han sido utilizadas en el campo de la oncología para inhibir la actividad biológica de proteínas. Nuestra molécula pequeña el Inh-YY1 es capaz de inhibir la actividad del factor de transcripción YY1. YY1 puede regular de manera positiva la expresión de MDR1 y de forma negativa la expresión de Fas generando resistencia a los fármacos lo que representa un mal pronóstico para los pacientes con este padecimiento.

Objetivo. Evaluar el efecto de un inhibidor de la actividad de YY1 en la sensibilización de células de LLA a etopósido.

Métodos. Se evaluó la expresión del factor de transcripción YY1 en células de LLA pediátrico. Se utilizó una molécula pequeña (Inh-YY1) en combinación con el agente quimioterapéutico etopósido para evaluar su efecto en la sensibilización de células CCRF-SB de LLA. Se analizó la expresión del gen MDR1 y del gen Fas en presencia del Inh-YY1. Se analizó la expresión de la caspasa 3 activa mediante citometría de flujo para evaluar la apoptosis. Para corroborar lo anterior se realizó una prueba TUNEL in-situ para medir la presencia de células apoptóticas.

Resultados. Se demostró que YY1 se expresa en las células CCRF-SB de LLA pediátrico. Se determinó que en las células CCRF-SB las bajas dosis del agente quimioterapéutico etopósido y del Inh-YY1 no tienen un efecto significativo en la sensibilización de las células al tratamiento. Se demostró que al inhibir la actividad del factor de transcripción de YY1 en las células, disminuye la expresión del gen MDR1 y aumenta la expresión del gen Fas. Se observó también que la combinación del Inh-YY1 con etopósido sensibiliza las células al tratamiento revirtiendo la resistencia al fármaco.

Conclusiones. Se demostró que al inhibir la actividad del factor de transcripción YY1 mediante una molécula pequeña (Inh-YY1) se sensibiliza a las células de LLA a etopósido por lo que esta molécula es capaz de revertir la quimioresistencia.

INTRODUCCIÓN.

Generalidades del cáncer.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo cuya característica es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. (OMS, 2018). Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales, generalmente se denominan por los órganos o tejidos donde se forman los cánceres y por el tipo de célula que los formó. Muchos cánceres forman tumores sólidos, que son masas de tejido; mientras que los cánceres de la sangre, como las leucemias, generalmente no forman tumores sólidos. (NCI, 2015)

Actualmente, el cáncer sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En 2012, hubo 14.1 millones de casos nuevos de cáncer y 8.2 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad en todo el Mundo (OMS, 2014). Se estima que en el 2018 el número de nuevos casos ascendió a 18 millones y las muertes a 9.6 millones. Los datos que pertenecen a GLOBOCAN 2018, una base accesible en línea que forma parte del IARC Global Cancer Observatory, también destacan que, al hablar de supervivencia, al menos 43,8 millones de personas están vivas a los 5 años del diagnóstico de la enfermedad. Debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, la OMS estima que para el 2030 los casos nuevos sobrepasarán los 20 millones anuales. (OMS, 2018). En México la magnitud de los efectos del cáncer en la salud del país no es muy diferente del panorama mundial ya que es la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. La Sociedad Mexicana de Oncología considera que las elevadas cifras de muertes por cáncer se deben a los diagnósticos tardíos. (SMeO, 2016).

El cáncer infantil.

El cáncer infantil es poco frecuente, pues representa entre un 0,5% y un 4,6% de la carga total de morbilidad por esta causa; cada año se diagnostica cáncer a aproximadamente 300.000 niños de entre 0 y 19 años (Steliarova-Foucher et al., 2017). Las tasas mundiales de incidencia oscilan entre 50 y 200 por cada millón de niños en las distintas partes del mundo (IARC, 2014). En los países de ingresos medianos y bajos incluidos México la tasa de curación puede variar desde el 20 o cercanas al 80% (Gupta et al., 2018).

El cáncer en México se encuentra reportado entre las principales causas de mortalidad para los grupos de 1 a 4 años y de 5 a 14 años. De acuerdo con los datos del Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA) las tasas de incidencia por millón hasta el 2017 fueron 89.6% Nacional, 111.4 en niños (0-9 años) y 68.1 en Adolescentes (10-19 años).

Los tipos más comunes de cáncer que se desarrollan en niños y adolescentes son la leucemia, el cáncer cerebral, el linfoma y los tumores sólidos como el neuroblastoma y el tumor de Wilms. En general, la leucemia representa alrededor de una tercera parte de todos los cánceres infantiles (Steliarova-Foucher et al., 2017)(Gupta et al., 2018)

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

En la infancia la neoplasia maligna más frecuente es la leucemia, que es una proliferación anormal de células derivada de alteraciones genéticas que afectan a algún tipo celular dentro de la médula ósea. Las leucemias se dividen en agudas y crónicas; cuando la alteración genética que altera el ciclo celular se produce en una

célula inmadura, hablamos de leucemias agudas y cuando se produce en una célula madura, de leucemias crónicas.

Las leucemias agudas representan el 97% de todas las leucemias en los niños; el otro 3% corresponde a las leucemias crónicas. Las leucemias linfoblásticas son las leucemias agudas más frecuentes (75%); mientras que el 25% restante corresponde a leucemias mieloides agudas (LMA) (SMeO, 2018).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en la edad pediátrica, con una incidencia de 3-4 pacientes por cada 100 000 menores de 18 años por año. Cada año se diagnostican alrededor de 2,500-3,000 niños en México y el pico de presentación es cerca de los cuatro años.

La LLA representa un grupo de entidades oncohematológicas de rápida evolución, clínica y biológicamente heterogéneas, caracterizadas por una proliferación descontrolada de glóbulos blancos inmaduros en la médula ósea y en la sangre e infiltración de estos a otros tejidos (Jiménez-Morales et al., 2017). En la médula ósea sana los leucocitos constituyen el 5% o menos, sin embargo, en la LLA hay un aumento de los estadios inmaduros que constituyen de entre el 30 y el 100% de la celularidad de la médula ósea; inhibiendo la producción de células hematopoyéticas normales como son eritrocitos, plaquetas y leucocitos.

La LLA comprende un grupo de neoplasias linfoides que se asemejan morfológicamente e inmunofenotípicamente al linaje B y T y pueden encontrarse tanto en la médula ósea como en la sangre periférica. En la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud, se designa a las neoplasias hematopoyéticas como leucemia linfoblástica de estirpe B o T, donde las de linaje B comprenden el 85% del total de LLA (Onciu, 2009).

Algunos signos y síntomas que presenta esta enfermedad se correlacionan con la carga de células leucémicas y el grado de sustitución de la médula ósea. Los síntomas más comunes son fiebre, fatiga y letargo, dolor óseo y articular. 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 cabeza y cuello o lesiones aisladas del hueso. Las anomalías de laboratorio más comunes en la LLA incluyen anemia, trombocitopenia, neutropenia y leucopenia o leucocitosis, con 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 tumoral (Onciu, 2009).

La investigación de 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. (McLean, et al., 1996)

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 y neurofibromatosis (Chessells et al., 2001).

Diagnóstico y tratamiento de la LLA

Hasta hace algunos años, el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) clasificaba a la LLA con base en la morfología de las células leucémicas (subtipo L1, L2 y L3); sin embargo, la clasificación actual también se basa en el inmunofenotipo (Jiménez-Morales et al., 2017) (Swerdlow et al., 2008). 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) (Onciu, 2009).

La LLA-B se caracteriza principalmente por la expresión de inmunoglobulinas citoplasmáticas y marcadores como CD19, CD20, CD22, CD24 y CD79a. Una gran proporción de LLA-B también expresan CD10 (que es un antígeno común de leucemia linfoblástica aguda), el cual es un antígeno constantemente expresado en las células B progenitoras. La LLA-T se caracteriza por la expresión de CD3 citoplasmático, CD7, CD5 o CD2. Un pequeño grupo (<5%) de casos de LLA son de linaje ambiguo, es decir, expresan marcadores linfoides y mieloides (bifenotípica) o presentan dos poblaciones celulares (bilineal) (Jiménez-Morales et al., 2017) (Onciu, 2009) (Biondi et al., 2000).

El diagnóstico definitivo de una leucemia aguda siempre se debe realizar mediante el análisis morfológico, molecular y citogenético del aspirado de la médula ósea. La presencia de al menos un 25% de blastos en la MO confirmará el diagnóstico. El subtipo de LLA se definirá con los estudios morfológicos, de biología molecular y citogenéticos. El diagnóstico correcto es esencial para la clasificación de este grupo heterogéneo de enfermedades, además de que juega un papel importante para la clasificación del paciente y el tratamiento quimioterapéutico; la evaluación inicial se obtiene a partir de un recuento total de leucocitos 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 (Lassaletta Atienza, 2016).

El tratamiento de los pacientes con LLA debe adaptarse al riesgo de cada paciente, incluyendo el tratamiento inmediato y la prevención de complicaciones metabólicas o infecciosas (Pui et al., 2009). La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad heterogénea con varios subtipos, por lo que no siempre es apropiado un solo tratamiento (Sánchez et al., 2007).

Para el manejo quimioterapéutico de la leucemia linfoblástica aguda se emplean combinaciones con base en el consorcio BFM (Berlín-Frankfurt-Münster) con ciclofosfamida, altas dosis de metotrexato, etopósido y citarabina (Sánchez et al., 2007). El tratamiento de las leucemias que afectan a las precursoras de las células B y T consiste en tres fases (Pui et al., 2004).

- *Inducción de la remisión.* En esta fase se pretende destruir la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se utilizan medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de ADN, como vincristina, prednisona y L-asparginasa, especialmente en niños. Con el tratamiento adecuado el grado de remisión es de 70 a 90% (Lassaletta Atienza, 2016).
- *Tratamiento de consolidación o postremisión.* Una vez restaurada la hematopoyesis se inicia el tratamiento de consolidación, en esta fase el objetivo es destruir las células residuales que han superado la etapa previa; se pueden emplear medicamentos que afectan la síntesis de ADN y que pueden destruir las células en reposo o fuera del ciclo G0 del ciclo celular. Los niños con leucemia de alto riesgo (debido a cambios genéticos o cromosómicos en las células de la leucemia o porque todavía hay una enfermedad mínima residual después de la inducción) generalmente reciben quimioterapia más intensiva. Con frecuencia se usan medicamentos adicionales como L-asparginasa, doxorubicina (adriamicina), etopósido,

ciclofosfamida y citarabina (ara-C) y se sustituye la dexametasona por prednisona (Lassaletta Atienza, 2016) (Sánchez et al., 2007) (ACS, 2019).

- *Tratamiento de mantenimiento.* Al ser una continuación de la remisión, tiene como objetivo destruir las últimas células residuales leucémicas, Con la administración de medicamentos que intervienen en la síntesis de ADN como la mercaptopurina y el metrotexato que son tolerados adecuadamente y se administran durante dos o tres años para generar la adecuada mielosupresión. La recaída de la medula ósea, con o sin afección extramedular, se puede interpretar como mal pronóstico para los pacientes (Sánchez et al., 2007).

En los niños, la tasa global de curación de las LLA se sitúa en torno al 70%, mientras que en los adultos es de un 30-40%. En cualquier caso, estos resultados dependen del subtipo de LLA, así como de la existencia de determinados factores pronósticos como son la edad, la presencia de determinadas alteraciones en los cromosomas, de la rapidez con la que se responde al tratamiento y del grado de eliminación de la enfermedad oculta (también llamada enfermedad residual) (Ribera Santasusana, 2001).

ANTECEDENTES.

ANTEDECENTES GENERALES.

Quimioresistencia en Leucemia Linfoblástica Aguda.

El término quimioterapia se refiere a los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas o cancerígenas que tiene como objetivo impedir la reproducción de las células cancerosas. (Picó C., 2019). En la actualidad se usan más de 100 medicamentos de quimioterapia en el tratamiento contra el cáncer, ya

sea solos o en combinación con otros medicamentos o tratamientos. Estos medicamentos son muy diferentes en su composición química, la manera en que se administran, su utilidad en el tratamiento de formas específicas de cáncer y sus efectos secundarios. (ACS, 2019)

Las células cancerosas tienden a formar nuevas células con mayor rapidez, lo cual las convierte en un objetivo más fácil de atacar por parte de los medicamentos de quimioterapia. Sin embargo, los medicamentos de quimioterapia no pueden diferenciar entre las células sanas y las células cancerosas. Esto significa que las células normales son dañadas junto con las células cancerosas, y esto causa efectos secundarios (ACS, 2019). Además, otro obstáculo importante que afecta su eficacia para lograr la curación completa en algunos cánceres avanzados es la aparición de resistencia a los agentes quimioterapéuticos. (Picó C., 2019)

La resistencia que puede generar la célula cancerosa a determinados fármacos o compuestos químicos que usualmente son letales, se le conoce como quimiorresistencia (Astudillo-de la Vega, et al., 2010). Dicha resistencia puede dividirse en 2 categorías: intrínseca y adquirida. (Mansoori et al., 2017).

La resistencia intrínseca indica que antes de recibir la quimioterapia, existen factores preexistentes mediadores de la resistencia que hacen que la terapia sea ineficaz. Mientras que la resistencia adquirida puede desarrollarse durante el tratamiento de tumores que inicialmente eran sensibles pero que por mutaciones que surgen durante el proceso del tratamiento o por la activación de otras respuestas adaptativas, los tumores pierden la sensibilidad y se vuelven resistentes (Mansoori et al., 2017).

La resistencia de las células cancerosas contra los agentes anticancerígenos puede deberse a diversos factores como la administración de una dosis insuficiente, la falta de activación del fármaco, la inhibición de la muerte celular, la inactivación metabólica, cambios epigenéticos, mutaciones en los objetivos farmacológicos, el aumento en la capacidad de reparación del DNA, la amplificación de los genes objetivo y la reducción de acumulación de los fármacos (Higgins, 2007).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Factor de transcripción Ying-Yang 1 en cáncer

El factor de transcripción Yin Yang 1 (YY1), también conocido como δ , NF-E1, UCRBP y CF1, es un factor de transcripción multidominio C2H2 conservado evolutivamente que contiene dedos de zinc (Sarvagalla, Kolapalli, & Vallabhapurapu, 2019). Es miembro de la familia de proteínas Polycomb que pertenece al grupo de receptores del gen homeobox, que juega un papel fundamental en la hematopoyesis y control del ciclo celular. El gen YY1 se compone de cinco exones altamente conservados que codifican una proteína de 414 aminoácidos de longitud y peso molecular estimado de 68kDa. En el ser humano el gen YY1 produce ocho diferentes transcritos (a, b, c, d, e, f, g, y h) generado por empalme alternativo, que codifica ocho diferentes isoformas (Gordon et al., 2006).

YY1 está involucrado en el control transcripcional de un gran número de genes de mamíferos, aproximadamente el 10% del total de los genes (Khachigian, 2018). De esta forma YY1 juega un papel importante en una serie de procesos biológicos, incluyendo el control del ciclo celular, la embriogénesis, la infección viral, la apoptosis, la oncogénesis y el desarrollo de células B (Sui et al., 2004). Dependiendo de cofactores (interacción proteína-proteína-PPI), el entorno del promotor y la estructura de la cromatina se demostró que YY1 es capaz de regular la expresión de muchos genes ya sea positiva o negativamente. El papel dual de YY1 como factor de transcripción depende del contexto celular, es decir, de la presencia de los cofactores (Sarvagalla et al., 2019).

YY1 se encuentra sobreexpresado en diversos tumores como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, osteosarcoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, linfoma de células B, linfoma folicular y LLA (Sarvagalla et al., 2019) (Atchison et al., 2011) (Q. Zhang et al., 2011).

La sobreexpresión de YY1 se asocia a metástasis pulmonar, de células de laringe, de cáncer epitelial de ovario y de melanoma. (S. Wu et al., 2013) (Qu, et al., 2017) (Xia et al., 2016) (Zhao et al., 2015). Además, la sobreexpresión de YY1 también se ha correlacionado con un mal pronóstico con osteosarcoma, tumor de Wilms (Zapata-Tarres et al., 2019), LLA y mieloma múltiple.

Interesantemente en estudios *in vitro* o *in vivo* se ha observado que al inhibir a YY1 se suprime la metástasis y la quimiorresistencia. La sobreexpresión de miR-381 inhibe a YY1 favoreciendo la supresión de la proliferación, la invasión y la migración de células de cáncer epitelial de ovario (Xia et al., 2016). El silenciamiento de YY1 inhibe también la invasión y migración de melanoma (G. Zhao et al., 2015). En estudios previos hechos en nuestro laboratorio observamos que la inhibición de YY1 a través de un siRNA sensibiliza las células de mieloma múltiple a la quimioterapia basada en bortezomib (Huerta-Yepey et al., 2014). Nuestro laboratorio también ha demostrado que la inhibición de YY1 usando moléculas no específicas como el DETANONOato que es un donador de óxido nítrico permiten sensibilizar a las células de cáncer de próstata a la quimioterapia. Por ejemplo, cuando las células de cáncer de próstata son tratadas con un inductor de apoptosis como el TRAIL en conjunto con el óxido nítrico se observa una mayor muerte por apoptosis tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, además sensibiliza las células al tratamiento con el quimiofármaco CDDP (Cis-diaminodicloroplatino II o cisplatino) (Huerta-Yepey et al., 2009).

Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que YY1 induce resistencia a la quimioterapia en la LLA al inducir la expresión del gen *MDR1*. En muestras de pacientes con LLA hemos encontrado altos niveles de expresión de YY1 y *MDR1* y estos niveles se asocian a una menor supervivencia. Adicionalmente, la línea celular de LLA RS4;11 disminuye los niveles de *MDR1* y mejora su sensibilidad al etopósido cuando las células son tratadas con un siRNA que inhibe la expresión de YY1 (Antonio-Andrés et al., 2018).

MDR1 está codificado por el gen *ABCB1*, que consiste en una región de 210 kb con 29 exones, ubicada en la región cromosómica 7q21. Su transcripción da lugar a 4 variantes de ARNm, traducidas, para tres de ellas, en una sola proteína de 1280 aminoácidos. A nivel de proteína *MDR1* está formado por un único monómero de 170kDa de 12 dominios transmembrana TM (Figura 1).

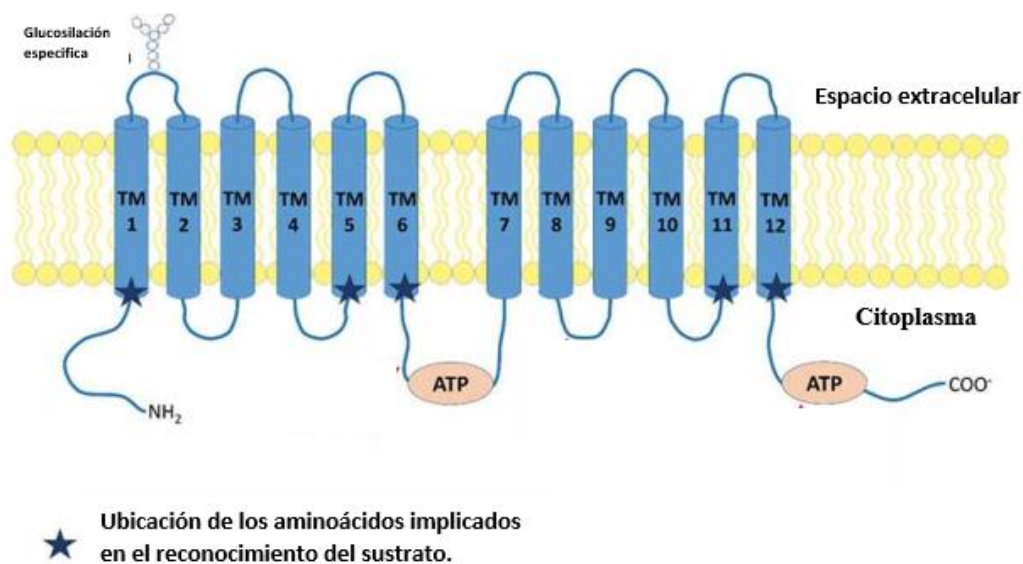


Figura 1. Estructura proteica y conformación de *MDR1*. *MDR1* está compuesto por 12 dominios transmembrana TM y dos dominios de unión a ATP citoplasmáticos ubicados en el bucle entre los TM 6 y 7 y el bucle después del TM 12. Modificado de (Bossenne, Di Roio, Caux, & Ménétrier-Caux, 2018).

La proteína MDR1 ha sido caracterizada bioquímicamente como una glicoproteína de membrana plasmática que se extiende en la bicapa lipídica. MDR1 constituye un sistema de detoxificación natural que activamente exporta xenobióticos al exterior celular y se expresa en varios tejidos humanos normales que se asocian con diversas funciones de barrera y secretoras. Fisiológicamente, MDR1 se expresa en varios tejidos (intestino, colon, placenta, hígado, barrera hematoencefálica) donde juega un papel protector ante cualquier daño potencial a la célula (Goldstein et al., 1989) (Bossennec et al., 2018). En el cáncer MDR1 funciona también como una bomba expulsora de fármacos.

Se ha propuesto 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 (Figura 2) (Ruiz Gómez et al., 2002).

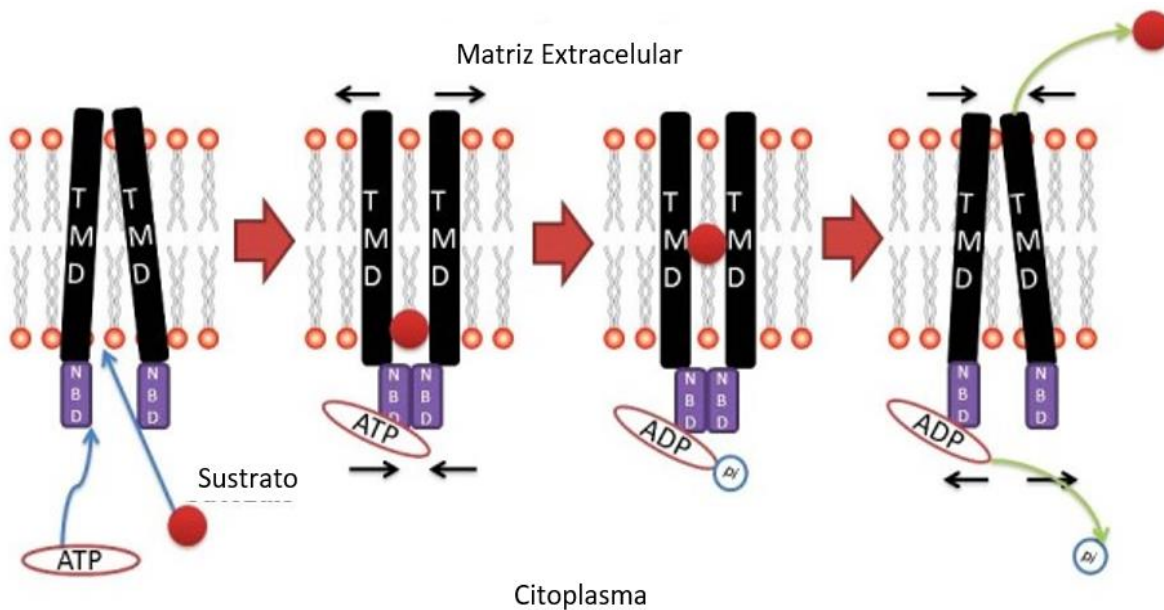


Figura 2. Mecanismo de liberación de drogas a través de transportadores ABC fuera de la célula. Después de unir la sustancia (fármaco), el ATP se hidroliza, el grupo fosfato se libera y la energía de la hidrólisis del ATP conduce a un cambio conformacional provocando que el fármaco se libere en el espacio extracelular. Modificado de (Mansoori et al., 2017)

La sobreexpresión de MDR1 en cáncer tiene fuertes implicaciones clínicas en los pacientes ya que se ha observado que una sobreexpresión de esta proteína se asocia a una falla al tratamiento, mal pronóstico y menor tasa de supervivencia en las diferentes neoplasias hematológicas incluida la LLA (Olarte-Carrillo I. et al., 2010) (Goldstein et al., 1989) (Abd El-Ghaffar, Aladle, Farahat, & Abd El-Hady, 2006) (Antonio-Andrés et al., 2018). Dado su impacto en el éxito del tratamiento, 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.

La mayoría de los posibles sustratos antitumorales de MDR1 son los alcaloides de la vinca como lo son la vincristina y la vinblasina, las antraciclinas como daunorrubicina y doxorrubicina, los inhibidores de cinasa de tirosina las epipodófilotoxinas como el tenopósido y el etopósido (Higgins, 2007) (Ueda, 1997) (Ruiz Gómez et al., 2002) (Fernández Aguila et al., 1998).

El etopósido es un derivado semisintético aislado de las raíces secas y rizomas de las plantas *Podophyllum peltatum* y *Podophyllum emodi*, actúa como inhibidor de la topoisomerasa II dependiente del ciclo celular y es fase específica (afecta principalmente fase S y G2). Su vida media de eliminación esta entre 5 y 10 horas (Drugbank, 2016) (Kawashiro, 1998). Los fármacos inhibidores de las topoisomerasas se unen de forma fija a ellas y al DNA, estabilizando las rupturas de este. Al impedirse el restablecimiento de la integridad del DNA se inicia el proceso de la muerte celular (Rincon, et al., 2006).

Moléculas pequeñas como alternativas de tratamiento clínico.

El enfoque del desarrollo de nuevos medicamentos se ha desplazado hacia la identificación y el objetivo de los factores moleculares del cáncer como son su iniciación y progresión que dependen de la sobreactivación de varias vías de señalización extrínsecas e intrínsecas (Lavanya, Adil, Ahmed, Rishi, & Jamal, 2014). Hay dos enfoques principales para la terapia del cáncer: anticuerpos monoclonales (mAbs) y pequeñas moléculas. Los anticuerpos monoclonales se caracterizan por su alta selectividad; sin embargo, sus objetivos suelen estar restringidos a la superficie de la célula y requieren una dosis intravenosa o subcutánea debido a su gran peso molecular. En cambio, los inhibidores de moléculas pequeñas varían en selectividad, pueden administrarse vía oral y, debido a su pequeño tamaño ($\leq 500\text{Da}$) existe una gama más amplia de objetivos extracelulares e intracelulares ya que pueden atravesar la membrana plasmática (Bedard, Hyman, Davids, & Siu, 2020). Los medicamentos de moléculas pequeñas inhiben objetivos críticos del cáncer como: la serina/treonina/tirosina quinasa, las metaloproteinasas de matriz (MMP), las proteínas de choque térmico (HSP), los proteosomas y otras proteínas que desempeñan un papel fundamental en las vías de transducción de señales para el crecimiento celular y la promoción de la metástasis (Lavanya et al., 2014). Hasta la fecha, hay 43 inhibidores de moléculas pequeñas aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para indicaciones oncológicas; muchos de estos fármacos muestran una superioridad sobre la quimioterapia citotóxica, con menos efectos secundarios como terapia de primera línea en el entorno recurrente o metastásico. El desarrollo de los inhibidores de moléculas pequeñas ha seguido dos caminos relacionados, aunque independientes, definidos en gran medida por los perfiles de selectividad de los objetivos (Bedard et al., 2020).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Efferth en Alemania se desarrolló una molécula pequeña con potencial capacidad de inhibir la actividad de YY1 (Inh-YY1) mediante el uso la tecnología computacional

denominada diseño racional de moléculas con potencial farmacológico basado en múltiples compuestos (quimioteca). Esta tecnología se basa en el método de acoplamiento molecular, el cual permite predecir la orientación de dos moléculas cuando estas interactúan entre sí para formar un complejo estable y que es la principal herramienta para el diseño de fármacos (Van Den Heuvel-Eibrink, Sonneveld, & Pieters, 2000) (L. Wu et al., 2007) (Lengauer & Rarey, 1996). El inhibidor, fue sintetizado por nuestros colaboradores alemanes (Grupo del Dr. Efferth).

En un ensayo previo en nuestro laboratorio, se incubaron células RS4;11 y CCRF-CEM en presencia del Inh-YY1 y los resultados mostraron que por sí solo el inhibidor no disminuye la viabilidad celular cuando se compara con células no tratadas. Además, mediante un ensayo de EMSA se encontró que el Inh-YY1 reduce la unión del factor de transcripción YY1 al DNA. Finalmente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que cuando las células se incuban con el inhibidor en combinación con el quimiofármaco vincristina y metrotexate se disminuye significativamente la viabilidad celular en comparación con las células tratadas únicamente con el quimiofármaco, lo anterior nos indica que el inhibidor tiene efecto sobre la viabilidad celular cuando se administra un quimiofármaco.

Debido a que actualmente el inhibidor se encuentra en trámites de patente, no nos es posible dar más información respecto a su diseño y síntesis.

Planteamiento del problema.

La leucemia es una neoplasia maligna caracterizada por la proliferación descontrolada en células hematopoyéticas de la médula ósea y se sabe que es una de las causas más comunes de cáncer en niños en México y en el Mundo. Dentro de los diversos tipos de leucemias la más frecuente entre la población infantil es la LLA. Representa el 75-80% de las leucemias agudas en edad pediátrica, predominando entre los 2 y 5 años.

A pesar de la eficiencia de los diversos agentes quimioterapéuticos que se han utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de la LLA, el desarrollo de la resistencia a los fármacos por las células tumorales continúa siendo un problema en la falla a los tratamientos en pacientes con este padecimiento. Una de las principales fallas en el tratamiento de la LLA es la resistencia a fármacos se debe a la existencia de proteínas cuyo papel principal es la expulsión de agentes tóxicos fuera de las células cancerosas, entre ellas destaca la sobreexpresión de MDR1.

Estudios recientes en el laboratorio identificaron que el promotor del gen *MDR1* contiene 4 sitios específicos de unión para el factor de transcripción YY1 y se estableció que dicho factor de transcripción actúa como regulador del gen. Además, observaciones previas en nuestro laboratorio, así como de otros grupos de trabajo indican que cuando se inhibe la actividad de YY1 mediante siRNAs u óxido nítrico existe un efecto positivo en la respuesta a los fármacos y a la inducción de la muerte celular. Dada la importancia de YY1 en la resistencia a fármacos y al valor pronóstico que tiene en los pacientes, se vuelve indispensable desarrollar nuevas y mejores estrategias que permitan evitar la acción de YY1 y con ello evitar la quimiorresistencia ya que hasta el momento ni los siRNAs ni el óxido nítrico representan una alternativa de tratamiento. En ese sentido nació el interés en nuestro laboratorio por diseñar una molécula pequeña capaz de inhibir la actividad de YY1.

En la actualidad, debido a los avances biotecnológicos se ha implementado la creación de una amplia gama de terapias que incluyen vacunas, terapias celulares,

hormonas, citocinas, anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas son moléculas orgánicas que poseen una actividad biológica determinada por el hecho de que se unen al sitio activo de una proteína responsable de la enfermedad, denominada “blanco molecular”. En cuanto al desarrollo de nuevos fármacos, sólo en la última década, la Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado 183 moléculas pequeñas (Mullard, A 2010) para tratar diversas enfermedades incluido el cáncer. La finalidad de este proyecto consiste en evaluar la eficacia de una molécula pequeña (denominada Inh-YY1) para sensibilizar a las células cancerosas al fármaco etopósido que es uno de los principales agentes quimioterapéuticos utilizados en la LLA.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar el efecto de un inhibidor de la actividad de YY1 en la sensibilización de células de LLA a etopósido.

Objetivos específicos.

- Evaluar la expresión de YY1 en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA por inmucitoquímica.
- Evaluar la toxicidad del etopósido en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA mediante una curva de dosis-respuesta.
- Determinar una dosis subtóxica de etopósido en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA.
- Evaluar la toxicidad del Inh-YY1 en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA mediante una curva de dosis-respuesta.
- Determinar una dosis subtóxica del inhibidor de YY1 en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA.
- Evaluar el efecto del Inh-YY1 en la expresión del gen MDR1 en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA.
- Evaluar el efecto del Inh-YY1 en la expresión del gen Fas en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA.
- Evaluar el efecto del Inh-YY1 en la apoptosis mediada por etopósido en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA mediante detección de caspasa 3 activa.
- Evaluar el efecto del Inh-YY1 en la apoptosis mediada por etopósido en la línea celular CCRF-SB derivada de LLA mediante TUNEL-in situ.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Cultivo Celular.

La línea celular CCRF-SB obtenida del ATCC (American Type Culture Collection, EUA) deriva de un niño de origen caucásico de 11.5 años diagnosticado con LLA de células B. Las células fueron cultivadas en medio Advanced RPMI 1640 suplementado al 4% con suero fetal de bovino, L-glutamina y una mezcla de antibiótico-antimicótico (todos de la marca Gibco®, EUA) a 37 °C en atmósfera húmeda y una mezcla de 5% CO₂ y 95% aire. Para el mantenimiento de los cultivos se practicó un cambio de medio cada dos a tres días. Para todos los ensayos se usaron cultivos que presentaban una viabilidad mayor o igual al 90% mediante el método de conteo en cámara de Neubauer y exclusión con azul tripano.

Ensayos dosis-respuesta.

Para evaluar la toxicidad del etopósido y del Inh-YY1 en la línea celular CCRF-SB, en una placa de 96 pozos se sembraron 50,000 células por pozo y se incubaron a diferentes concentraciones de etopósido (en un rango de 0 a 10µM) o de Inh-YY1 (en un rango de 0 a 20µg/ml) durante 24 horas. Posteriormente, la viabilidad celular fue evaluada mediante un ensayo de MTS usando el kit Promega (Cat. G6320) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, después de los tratamientos se adicionó el reactivo MTS a la placa a una concentración final de 0.33 mg/ml. Las células fueron incubadas durante 2 horas a 37°C. La absorbancia se leyó a 490nm en un lector de placas EnSpire® (PerkinElmer).

Análisis del efecto del Inh-YY1 en la transcripción.

Para evaluar el efecto del Inh-YY1 en la transcripción de los genes blanco del factor de transcripción YY1, las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de

6µg/ml del Inh-YY1 durante 24h y posteriormente la expresión de MDR1 y Fas fue analizada por inmunocitoquímica.

Ensayo de Inmunocitoquímica (ICQ).

Para evaluar la expresión basal de YY1, 20,000 células fueron fijadas con metanol a 4°C durante 10min y posteriormente lavadas dos veces en agitación constante con PBS durante 5min. Para evaluar la expresión de MDR1 y Fas las células fueron lavadas y fijadas después de cumplir el tratamiento con el Inh-YY1. Brevemente, la recuperación antigénica fue realizada usando citrato de sodio (0.01M, pH 6.0). La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió usando peróxido de hidrógeno al 3% en metanol. La unión no específica se bloqueó sumergiendo las laminillas en solución de leche al 10% en PBS durante 1 hora. Las laminillas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-YY1 (dilución 1:2000, Novus Biologicals NBP2-20932), anti-Fas (dilución 1:500, Novus Biologicals NBP1-41407) y anti-MDR1 (dilución 1:2000, Abcam ab129450). Las laminillas se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario ImmPRESS® (Horse Anti-Mouse IgG, Polymer Kit, Peroxidase, Cat. No.:MP-7402) cuyo sistema de amplificación enzimático produce una tinción nítida, altamente sensible y específica (dilución 1:1000) durante 1 hora. Pasado este tiempo se realizaron 3 lavados con PBS y posteriormente se añadió una solución de diaminobencidina (DAB) en una dilución 1:300 (ImmPACT® DAB, Cat. No.: SK-4105) la cual en presencia de la enzima peroxidasa genera un producto de reacción marrón. La reacción se detuvo con agua y las laminillas se contra tiñeron con hematoxilina. Las laminillas se deshidrataron y se cubrieron con resina y se secaron a temperatura ambiente.

Inducción de apoptosis.

Para evaluar el efecto del Inh-YY1 en la reversión de la resistencia a etopósido, se indujo un ensayo de apoptosis en la línea celular CCRF-SB. En placas de 6 pozos,

500,000 células fueron sembradas e incubadas en presencia o ausencia de 6µg/ml de Inh-YY1 durante 24h. Posteriormente las células fueron incubadas en presencia o ausencia de la dosis subtóxica de 20nM/ml de etopósido por 14h. Posteriormente se evaluó la apoptosis por el ensayo de TUNEL in situ y detección de caspasa 3 activa por citometría de flujo.

Ensayo de TUNEL (Transferase dUTP nick end labeling) in situ.

Posterior a la inducción de apoptosis, 20,000 células fueron fijadas con formaldehído al 4% por 20min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS y se procedió al protocolo de TUNEL. Brevemente, la recuperación antigénica fue realizada usando citrato de sodio (0.01M, pH 6.0). La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió usando peróxido de hidrógeno al 3% en metanol. La unión no específica se bloqueó sumergiendo las laminillas en solución de leche al 10% en PBS durante 1 hora.

Brevemente, los fragmentos de la cadena de ADN se identificaron marcando las terminales 3'-OH con nucleótidos modificados en una reacción enzimática por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (In Situ Cell Death Detection Kit, ROCHE) que cataliza la polimerización de los nucleótidos marcados para liberar los extremos del ADN 3'-OH. Las laminillas fueron cultivadas con la solución enzimática en una dilución 1:400 (In situ cell death kit, ROCHE) en cámara húmeda a 37°C durante 1h. Después de 3 lavados con PBS las laminillas se incubaron con la mezcla de reacción de TUNEL (POD) que detecta fragmentos Fab de anticuerpos anti-fluoresceína conjugados con peroxidasa en una dilución 1:400 (In situ cell death kit, ROCHE) en cámara húmeda a 37°C durante 1h. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS y posteriormente se añadió una solución de diaminobencidina (DAB) en dilución 1:300 (ImmPACT® DAB, Cat. No.: SK-4105) la cual en presencia de la enzima peroxidasa genera un producto de reacción marrón. La reacción se detuvo

con agua y las laminillas se contra tiñeron con hematoxilina. Las laminillas se deshidrataron y se cubrieron con resina y se secaron a temperatura ambiente.

Detección de caspasa 3 activa por citometría de flujo.

Posterior a la inducción de apoptosis, las células fueron lavadas con PBS y se procedió a la detección de caspasa 3 activa mediante citometría de flujo. Brevemente, las células se fijaron y permeabilizaron en 100µl de la solución fijadora/permeabilizadora del kit BD Cytfix/Cytoperm™ (Cat. No. 554714) por 1h a 4°C protegido de la luz. Las células se lavaron con 700µl de la solución de lavado del mismo kit. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-caspasa 3 activa acoplado a FITC (BD Pharmingen Cat. 559341) en una dilución 1:20 durante 1h a 4°C protegido de la luz. Las células se lavaron con 700µl de la solución de lavado y se resuspendieron en 400µl de formaldehído al 4% frío. El porcentaje de células positivas se analizó mediante citometría de flujo en un citómetro CytoFlex (Beckman Coulter). Un mínimo de 10,000 eventos fue analizado para cada condición.

Análisis de datos.

El análisis estadístico y las gráficas se realizarán con el programa Graph Pad Prism 6.0 por GraphPad Software Inc. Los datos se presentarán como medios aritméticos con desviaciones estándar. La evaluación de las diferencias en el número de células positivas y la densidad de la expresión de las reacciones de ICQ se determinará mediante una prueba de ANOVA unidireccional. Posteriormente se realizarán múltiples análisis de comparación utilizando la prueba de Tukey para identificar las diferencias entre los grupos. Se considerará significativa cuando los resultados presenten una $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

YY1 se encuentra sobreexpresado en LLA.

Se evaluó la expresión del factor de transcripción YY1 por inmunocitoquímica en las células CCRF-SB. Como se puede observar en color café en las microfotografías de la figura 3, la expresión de YY1 es nuclear en las células CCRF-SB. Interesantemente, la expresión de YY1 se puede observar con una mayor intensidad en algunas subpoblaciones celulares. El control de isotipo es negativo para la expresión de YY1 lo cual indica la especificidad de la tinción observada. Nuestros resultados muestran que YY1 se encuentra sobreexpresado en la línea celular CCRF-SB de LLA.

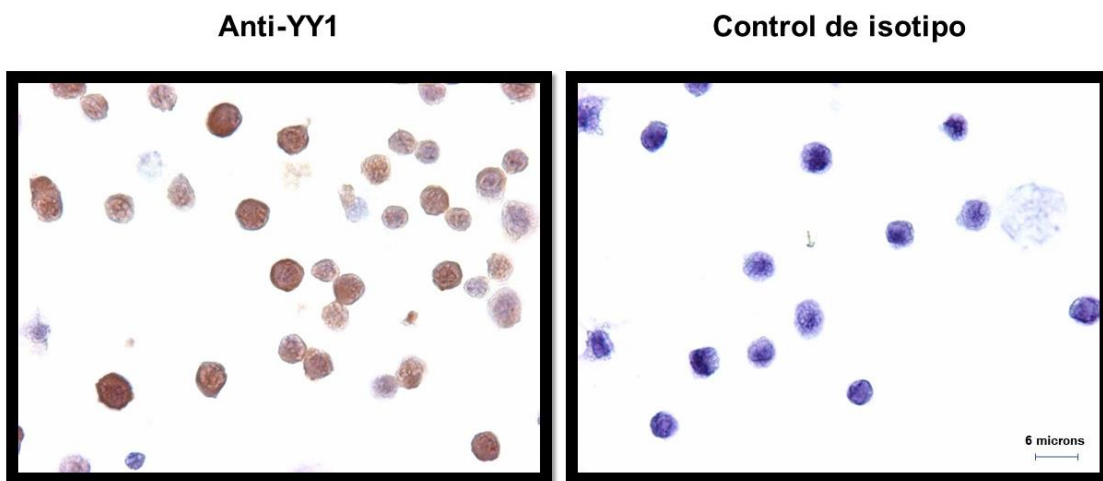


Figura 3. Expresión de YY1. Microfotografía representativa de la expresión de YY1 (mostradas en color café) en las células CCRF-SB. Magnificación 40x.

El etopósido es tóxico en células CCRF-SB en dosis micromolares.

Mediante un ensayo de viabilidad (MTS) se evaluó el efecto tóxico del ETO en las células CCRF-SB. En la figura 4 se puede observar la disminución en la viabilidad de las células a medida que aumenta la concentración de ETO. Dosis por debajo de 100nM no muestran una disminución significativa en la viabilidad celular.

Por el contrario, dosis micromolares ($\geq 1\mu\text{M}$) reducen de manera significativa la viabilidad celular ($p \leq 0.0001$). Interesantemente, se requieren dosis mayores de $10\mu\text{M}$ para observar una disminución en la viabilidad mayor al 50% en las células. Podemos concluir entonces que dosis micromolares de etopósido producen un efecto tóxico en células CCRF-SB disminuyendo de manera significativa la viabilidad celular.

Puesto que nuestro interés era usar una dosis de ETO que no afectara significativamente la viabilidad celular se usó la dosis de 10nM como dosis subtóxica en los ensayos subsecuentes.

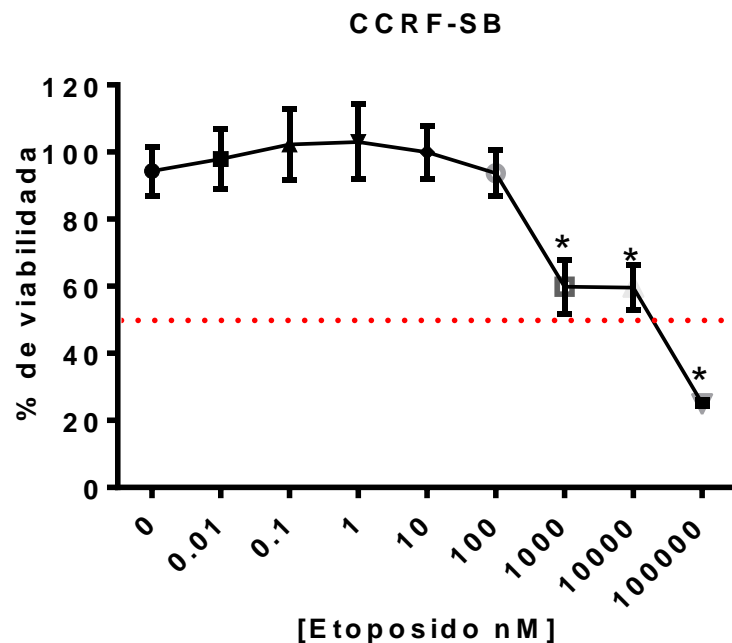


Figura 4. Curva dosis respuesta al fármaco etopósido. Las células CCRF-SB fueron incubadas por 48h a diferentes concentraciones de etopósido para posteriormente evaluar la viabilidad celular por ensayo de MTS. Los puntos representan el promedio de viabilidad con respecto al control (0nM) de un ensayo por triplicado. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante un análisis de ANOVA y la prueba Bonferroni para comparaciones múltiples. * $p \leq 0.0001$. La línea roja punteada representa el 50% de viabilidad.

En dosis bajas el Inh-YY1 no daña significativamente la viabilidad celular.

Mediante un ensayo de viabilidad (MTS) se evaluó el efecto tóxico del Inh-YY1 en las células CCRF-SB. En la figura 5 se observa la disminución de la viabilidad en las células a medida que aumente la concentración del Inh-YY1. En dosis iguales o menores a 8µg/ml no se observa una disminución significativa en la viabilidad celular. Por el contrario, en dosis mayores o iguales a 10µg/ml se observa que hay una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la viabilidad de las células CCRF-SB. Con base en estos resultados podemos concluir que a dosis bajas el Inh-YY1 no tiene un efecto importante sobre la viabilidad celular en células CCRF-SB.

Puesto que nuestro interés era usar una dosis de Inh-YY1 que no afectara significativamente la viabilidad celular se usó la dosis de 6µg/ml como dosis subtóxica en los ensayos subsecuentes.

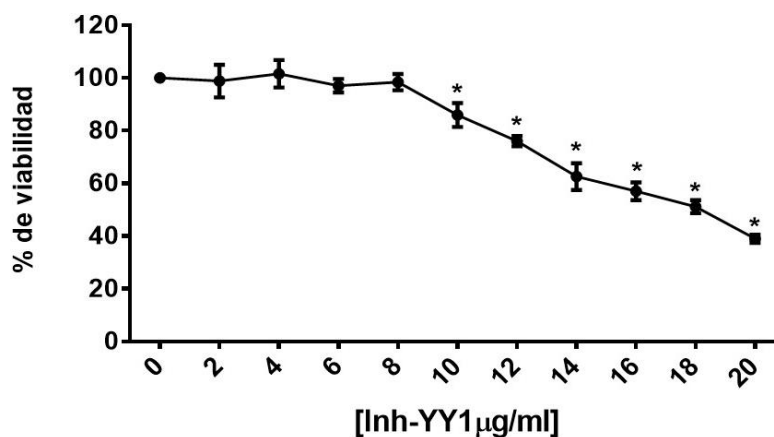


Figura 5. Curva dosis respuesta al Inh-YY1. Las células CCRF-SB fueron incubadas por 24h a diferentes concentraciones de Inh-YY1 para posteriormente evaluar la viabilidad celular por ensayo de MTS. Los puntos representan el promedio de viabilidad con respecto al control de un ensayo por triplicado. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante un análisis de ANOVA y la prueba Bonferroni para comparaciones múltiples. * $p \leq 0.05$.

El Inh-YY1 regula negativamente la actividad de YY1 impactando en la expresión de sus genes blancos MDR1 Y Fas.

Para evaluar el efecto del Inh-YY1 en la actividad del factor de transcripción YY1, se evaluó mediante la técnica de inmunocitoquímica la expresión del gen Fas. Se observa en las microfotografías de la figura 6, las células sin tratamiento presentan poca o nula expresión del *gen Fas*, mientras que las células incubadas con el Inh-YY1 presentan un aumento en la expresión de Fas que se puede observar en color café.

El control de isotipo es negativo para la expresión del gen Fas lo que indica la especificidad de la tinción observada.

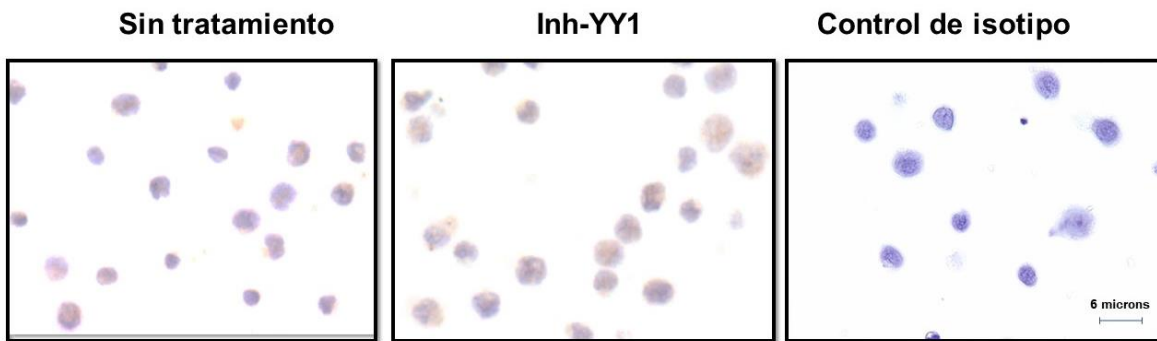


Figura 6. Expresión de Fas. Microfotografías representativas de la expresión de Fas (mostradas en café) en las células CCRF-SB. Magnificación 100x.

Para corroborar estos resultados se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real para evaluar la expresión del gen Fas. Nuevamente, observamos que tras el tratamiento con el Inh-YY1 aumenta de manera significativa la transcripción del gen Fas ($p= 0.001$) (Figura 7).

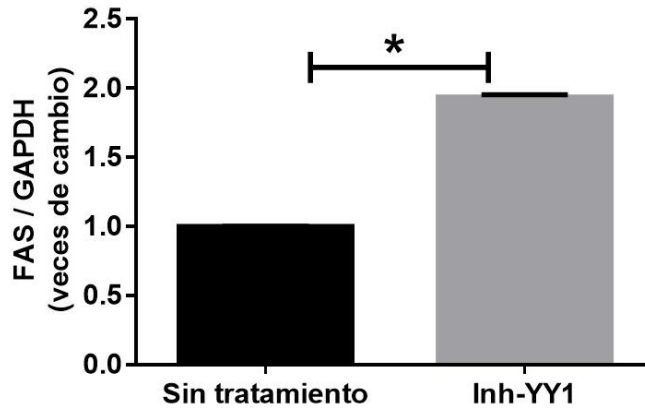


Figura 7. Análisis de la expresión de Fas por RT-PCR. Las barras representan la expresión relativa de Fas con respecto al gen control GAPDH de un ensayo por triplicado. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante una prueba de t de Student. * $p = 0.001$.

Al evaluar el efecto del Inh-YY1 en la expresión del gen MDR1 mediante la técnica de inmunocitoquímica observamos que las células sin tratamiento muestran una mayor expresión citoplasmática de MDR1 en comparación con las células tratadas con el Inh-YY1. El control de isotipo es negativo en la expresión del *gen MDR1* lo que indica la especificidad de la tinción observada (Figura 8). Nuestros resultados sugieren que el Inh-YY1 regula negativamente la actividad de YY1.

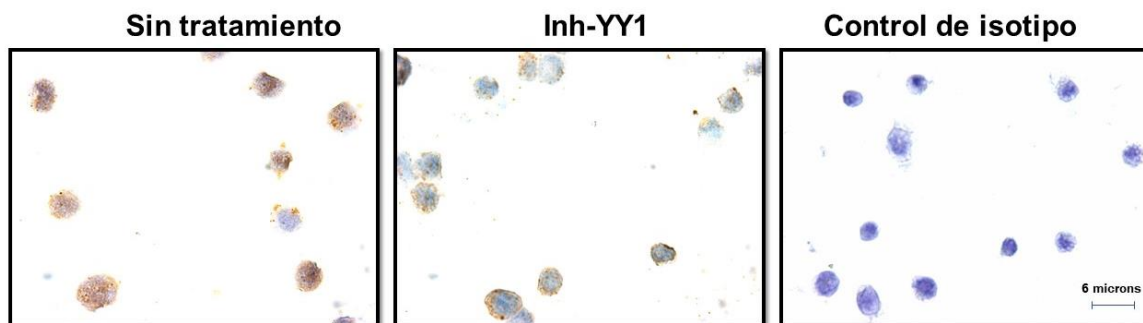


Figura 8. Expresión de MDR1. Microfotografías representativas de la expresión de MDR1 (mostradas en color café) en las células CCRF-SB. Magnificación 100x.

El Inh-YY1 sensibiliza a células de LLA a etopósido.

Para evaluar el efecto del Inh-YY1 en células CCRF-SB se realizó la medición de caspasa 3 activa en las células tratadas con o sin Inh-YY1 y con o sin ETO. Cuando las células son expuestas al ETO se puede observar un aumento mínimo de células positivas para caspasa 3 activa, pero cuando las células son tratadas tanto con ETO como con el Inh-YY1 la presencia de células positivas para caspasa 3 activa resulta aumentar de manera significativa ($p \leq 0.03$) (Figura 9). Interesantemente, observamos que las células incubadas solo con el Inh-YY1 no muestran un aumento de células positivas para caspasa 3 activa en comparación con las células sin tratamiento. Con base en estos resultados se puede concluir que al inhibir la actividad del factor de transcripción YY1 mediante una molécula pequeña inhibitoria se sensibiliza a las células CCRF-SB al tratamiento con ETO.

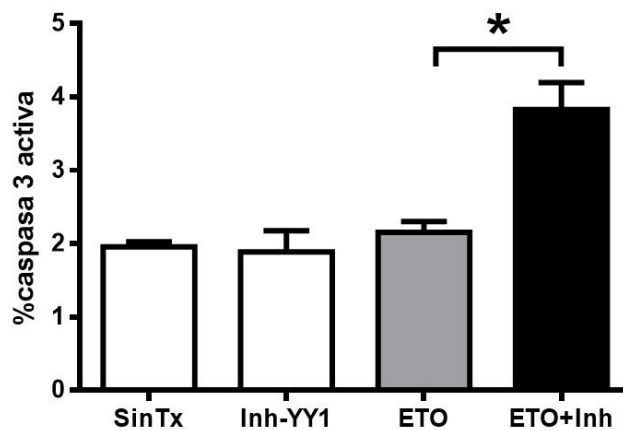


Figura 9. Efecto del Inh-YY1 en la inducción de apoptosis por etopósido. Análisis de la expresión de caspasa 3 activa por citometría de flujo. Las barras representan el promedio de células positivas para caspasa 3 activa para cada condición. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante un análisis de ANOVA y Tukey para comparaciones múltiples * $p \leq 0.03$. SinTx = Sin tratamiento, ETO = etopósido, ETO+Inh = etopósido+Inh-YY1.

Puesto que la medición de la caspasa 3 activa es utilizada para evaluar la apoptosis temprana de las células decidimos realizar un ensayo de TUNEL para poder evaluar la apoptosis tardía en las células. En la figura 10 podemos observar que existe un incremento en la apoptosis tardía, cuando las células son tratadas con ETO (células en color café). Por el contrario, en el tratamiento tanto con el Inh-YY1 como con el

ETO la presencia de células apoptóticas se encuentra aumentada. Nuevamente, podemos observar que después de utilizar el Inh-YY1 las células CCRF-SB se sensibilizan a ETO, mostrando resultados más efectivos al tratamiento.

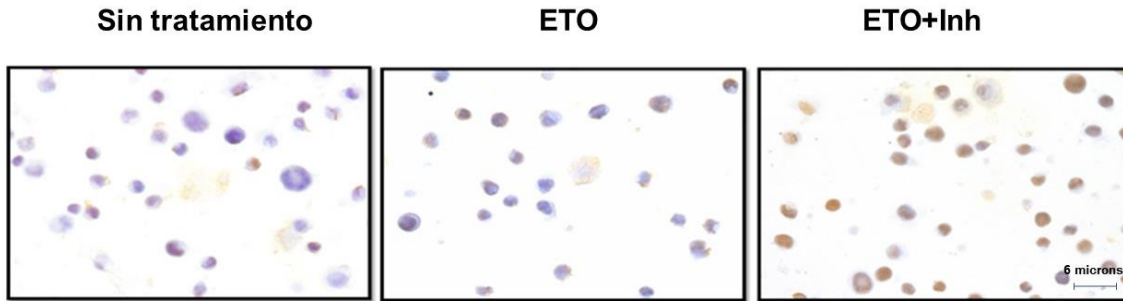


Figura 10. Efecto del Inh-YY1 en la inducción de apoptosis por etopósido. Análisis de la expresión de células apoptóticas mediante TUNEL *in situ*. Microfotografías representativas de células apoptóticas-TUNEL positivas (mostradas en café). Magnificación 20x. ETO = etopósido, ETO+Inh = etopósido+Inh-YY1.

DISCUSIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es principalmente una enfermedad pediátrica, cuya incidencia máxima se encuentra entre los 2 a los 5 años. La LLA es el cáncer más común en niños, representa aproximadamente el 75% de las leucemias en menores de 19 años y es la segunda causa más común de muerte. En México, menos del 65% de los casos sobreviven a 4 años posteriores al inicio del tratamiento aun cuando los esquemas de tratamientos actuales han aumentado la supervivencia de los pacientes (Antonio-Andrés et al., 2018). A pesar de ser una de las enfermedades malignas más frecuente durante la infancia, también puede presentarse durante la adolescencia y la edad adulta entre los 15 a los 39 años con un mal pronóstico, representando alrededor del 20% de las leucemias agudas en adultos (Lozano, 2002) (American Cancer Society, 2014).

La leucemia linfoblástica aguda tiene incidencia en la población menor a los 19 años y la tasa de mortalidad es alta. En México, menos del 65% de los casos sobreviven a 4 años posteriores al inicio del tratamiento aun cuando los esquemas de tratamientos actuales han aumentado la supervivencia de los pacientes.

El tratamiento con quimioterapia aumenta la respuesta y la supervivencia a muchos tipos de cáncer, sin embargo, su eficacia puede verse limitada por diversos mecanismos de resistencia que las células adquieren para evadir la acción de los fármacos y lo cual puede significar un mal pronóstico para los pacientes (Antonio-Andrés et al., 2018). Cabe mencionar que el tratamiento con quimioterapia puede tener efectos adversos difíciles de combatir, por esta razón se han investigado nuevos tipos de terapias dirigidas como son los anticuerpos monoclonales y las pequeñas moléculas.

Las moléculas pequeñas presentan un amplio espectro de objetivos como son los inhibidores de moléculas pequeñas que pueden ser demasiado específicas e inhibir de manera selectiva la función del objetivo determinado. En este trabajo se evaluó el efecto y la toxicidad de la molécula pequeña Inh-YY1 en células CCRF-SB

derivadas de LLA y se puso a prueba su eficacia como fármaco capaz de sensibilizar a las células a etopósido.

Nuestros primeros resultados demuestran que el factor de transcripción YY1 presenta una sobreexpresión nuclear en las células CCRF-SB que derivan de la LLA. Estudios recientes del laboratorio reportaron por primera vez la sobreexpresión de YY1 en diferentes líneas celulares derivadas de LLA teniendo como consecuencia una menor sensibilidad a diferentes agentes quimioterapéuticos (Artículo por publicar). Estos resultados se relacionan con diversas investigaciones que sugieren que YY1 está sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de colon (N. Zhang et al., 2013), el cáncer de ovario (Berchuck et al., 2005), el cáncer de mama (Allouche et al., 2008) (Thomassen, Tan, & Kruse, 2008), el cáncer de próstata (Seligson et al., 2015), el cáncer pancreático (J. J. Zhang et al., 2014), melanoma (G. Zhao et al., 2015), osteosarcoma (Nigris et al., 2011), glioblastoma (Baritaki et al., 2009) y por supuesto en leucemia linfoblástica aguda, lo que implica un mal pronóstico (Antonio Andrés et al., 2018).

Interesantemente se sabe que las células que expresan de manera natural altos niveles de YY1 son menos sensibles a los fármacos que las células que contienen bajos niveles (L. Zhao, Li, & Gan, 2018) (López-Perez et al., 2021) En este estudio se relacionó por primera vez la sobreexpresión de YY1 con la resistencia al fármaco etopósido en la línea celular CCRF-SB. Observamos que se requieren dosis micromolares ($\leq 1\mu\text{M}$) para reducir de manera significativa la viabilidad de las células, de hecho, se requieren dosis mayores a $10\mu\text{M}$ para reducir la población en un 50% lo cual sugiere que esta línea celular presenta quimioresistencia a este fármaco.

La asociación de la sobreexpresión de YY1 con la resistencia a fármacos se da a través de diferentes mecanismos regulados por este factor de transcripción entre los que destacan el exceso de eflujo del fármaco, la activación de las vías de supervivencia y la inhibición de la apoptosis (Perez, 2009) (López-Perez et al., 2021). YY1 es capaz de regular el exceso de eflujo a través de la regulación positiva de la

expresión de MDR1 (Antonio-Andrés et al., 2018) y de inhibir la apoptosis a través de la regulación negativa de la expresión de Fas (Martínez-Torres et al., 2020).

Nuestro estudio demostró que el Inh-YY1 disminuye la expresión de MDR1 en las células CCRF-SB. Se ha demostrado anteriormente que YY1 se encuentra regulando de manera positiva a MDR1 en las líneas celulares PC-3 y RS4;11. Cuando el YY1 es silenciado por medio del siRNA, la droga anticancerígena adriamicina se acumula en el interior de las células, ya que la adriamicina es un sustrato de MDR1 (Antonio Andrés et al., 2018). Estudios previos han asociado la alta expresión de MDR1 con la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos incluidos la vincristina (Helson, Zahn, & Helson, 1994) (Lum, Gisland, Kaubisch, & Sikic, 1993), el etopósido (Gosland et al., 1996) y el metrotexato (Yao et al., 2017) (Norris et al., 1996) en varios tipos de células. En ensayos clínicos sobre el cáncer de mama, la sobreexpresión de MDR1 se asoció con un riesgo tres veces mayor de no responder a la quimioterapia, y se observó que su expresión aumentaba después de la exposición a la quimioterapia (Trock, Leonessa, & Clarke, 1997).

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el Inh-YY1 incrementa de manera significativa la expresión de Fas en LLA lo cual sugiere que este gen está siendo regulado negativamente por YY1 en las células CCRF-SB. Se ha demostrado la correlación que existe entre los niveles bajos de Fas y la sobreexpresión de YY1 en células RS4;11 de LLA en adulto (J. J. Zhang et al., 2014). Los bajos niveles de Fas se asocian con un mal pronóstico (Lu. Et al., 2020) y una respuesta deficiente al tratamiento en la LLA pediátrica y en otros tumores (Li et al., 2019) (Jia et al., 2019).

Investigaciones realizadas con la línea celular de cáncer de próstata PC3 muestran un aumento en la expresión de Fas después del tratamiento con óxido nítrico (ON) ya que YY1 es inhibido por el ON a través de S-nitrosilación por lo que ya no puede reprimir la expresión de Fas (Hongo et al., 2005). De manera similar el ON aumenta la apoptosis mediada por Fas en el carcinoma de ovario (Garban & Bonavida, 2001). De manera interesante, la expresión de Fas podría ser inducida por algunos fármacos citotóxicos como son el etopósido (Ferraro et al., 2000), la vincristina (Lam, Findley, et. al, 2002) y el metrotexato (Friesen, Herr, Krammer, & Debatin, 1996) lo

cual sugiere que después de una exposición al fármaco, las células podrían estar induciendo la muerte celular después de la unión de Fas a su respectivo receptor ya que la inhibición de Fas resulta en una disminución de la apoptosis (Müller et al., 1997)(Fulda, Sieverts, et. al, 1997). Como consecuencia de que el Inh-YY1 inhiba la actividad del factor de transcripción YY1 se induce la sobreexpresión de Fas que sensibiliza a las células a la muerte inducida por Fas, de tal manera que podría ser utilizada para prevenir la evasión de la apoptosis por esta vía. Aunque también existen pruebas de que el etopósido puede inducir la apoptosis en una vía independiente de FasL/Fas (Ferraro et al., 2000). Además, el Inh-YY1 podría usarse en conjunto con terapias dirigidas a la inducción de apoptosis vía Fas. En conjunto estos resultados podrían explicar porque las células CCRF-SB se vuelven sensibles a dosis subtóxicas de ETO cuando son tratadas de manera simultánea con el Inh-YY1.

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento conjunto de Inh-YY1 y ETO incrementan de manera significativa las células apoptóticas en comparación con las células que solo reciben el tratamiento con ETO e interesantemente, el Inh-YY1 en la dosis usada no es tóxica en las células lo cual es relevante debido a que se busca evitar inducir un aumento de los efectos secundarios que normalmente son ocasionados por el tratamiento con quimioterapia. Nuestros resultados sugieren que la resistencia al ETO en las células CCRF-SB es regulado por la sobreexpresión de YY1 la cual a su vez induce la expresión de MDR1 e inhibe la expresión de Fas.

La sobreexpresión de YY1 tiene una gran relevancia clínica en el contexto del cáncer ya que se ha observado que YY1 puede inducir resistencia a más de un fármaco (Artículo por publicar), lo que podría explicar el fracaso del tratamiento en pacientes con niveles elevados de YY1 que incluye aspectos como mayor recaída y menor supervivencia (Antonio-Andrés et al., 2018). Dada la importancia clínica de la sobreexpresión de YY1 en cáncer resulta relevante contar con nuevas estrategias que permitan bloquear a este factor de transcripción.

La inhibición de YY1 mediante ON ha demostrado ser una estrategia con la capacidad de revertir la resistencia a los medicamentos, sin embargo, no ha sido probada en humanos debido a su amplio espectro de acción en diferentes factores de transcripción, o porque cualquier tipo de terapia génica, como lo es el siRNA, puede modificar las células permanentemente incluyendo a las células no objetivo. Por esta razón la molécula pequeña Inh-YY1 es de vital importancia por su potencial uso farmacológico capaz de revertir la multirresistencia en las células de la LLA y su efecto pro-apoptótico de los medicamentos vía sistema receptor / ligando FasL/Fas.

En la infancia, la leucemia linfoblástica aguda, la sobreexpresión nuclear de YY1 y la expresión citoplasmática de MDR1 se asocian con una baja supervivencia global (Antonio-Andrés et al., 2018).

CONCLUSIONES.

- YY1 se encuentra sobreexpresado en células CCRF-SB derivadas de LLA.
- Las células CCRF-SB de LLA son resistentes al fármaco etopósido.
- El Inh-YY1 en dosis bajas no daña significativamente la viabilidad de las células CCRF-SB derivadas de LLA.
- El Inh-YY1 regula negativamente la actividad del factor de transcripción YY1 que regula los genes Fas y MDR1.
- El Inh-YY1 sensibiliza a las células CCRF-SB derivadas de LLA al tratamiento con etopósido.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abd El-Ghaffar, H. A., Aladle, D. A., Farahat, S. E., & Abd El-Hady, N. (2006). P-Glycoprotein (P-170) expression in acute leukemias. *Hematology*.
<https://doi.org/10.1080/10245330400026204>
- American Cancer Society. (2014). Leucemia linfocítica aguda (en adultos). *Nih*.
- Antonio-Andrés, G., Rangel-Santiago, J., Tirado-Rodríguez, B., Martínez-Ruiz, G. U., Klunder-Klunder, M., Vega, M. I., ... Huerta-Yepez, S. (2018). Role of Yin Yang-1 (YY1) in the transcription regulation of the multi-drug resistance (MDR1) gene. *Leukemia and Lymphoma*.
<https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1448083>
- Atchison, M., Basu, A., Zaprazna, K., & Papasani, M. (2011). Mechanisms of Yin Yang 1 in oncogenesis: The importance of indirect effects. *Critical Reviews in Oncogenesis*. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v16.i3-4.20>
- Bedard, P. L., Hyman, D. M., Davids, M. S., & Siu, L. L. (2020). Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *The Lancet*.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30164-1)
- Benito, J., Shi, Y., Szymanska, B., Carol, H., Boehm, I., Lu, H., ... Konopleva, M. (2011). Pronounced hypoxia in models of murine and human leukemia: High efficacy of hypoxia-activated prodrug PR-104. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023108>
- Biondi, A., Cimino, G., Pieters, R., & Pui, C. H. (2000). Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood*.
https://doi.org/10.1182/blood.v96.1.24.013k01_24_33
- Bossennec, M., Di Roio, A., Caux, C., & Ménétrier-Caux, C. (2018). MDR1 in immunity: friend or foe? *OncolImmunology*.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1499388>
- Chessells, J. M., Harrison, G., Richards, S. M., Bailey, C. C., Hill, F. G. H., Gibson,

- B. E., ... Harrison, C. (2001). Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: Clinical features and response to treatment. *Archives of Disease in Childhood*. <https://doi.org/10.1136/ad.85.4.321>
- Fernández Aguila, J., Crombet Ramos, O., Villares Alvarez, I., & Pons Vázquez, R. (1998). Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P. *Rev. Cuba. Oncol.*
- Ferraro, C., Quemeneur, L., Fournel, S., Prigent, A. F., Revillard, J. P., & Bonnefoy-Berard, N. (2000). The topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide induce a CD95-independent apoptosis of activated peripheral lymphocytes. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400595>
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., & Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0596-574>
- Frolova, O., Samudio, I., Benito, J., Jacamo, R., Kornblau, S. M., Markovic, A., ... Konopleva, M. (2012). Regulation of HIF-1 α signaling and chemoresistance in acute lymphocytic leukemia under hypoxic conditions of the bone marrow microenvironment. *Cancer Biology and Therapy*. <https://doi.org/10.4161/cbt.20838>
- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., & Debatin, K. M. (1997). The CD95 (apo-1/fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Research*.
- Goldstein, L. J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S. L., Gazdar, A., ... Pastan, I. (1989). Expression of multidrug resistance gene in human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.2.116>
- Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H., & Bonavida, B. (2006). Transcription factor YY1: Structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209080>
- Gupta, S., Maheshwari, A., Parab, P., Mahantshetty, U., Hawaldar, R., Sastri, S., ... Badwe, R. (2018). Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Radical Surgery

- Versus Concomitant Chemotherapy and Radiotherapy in Patients With Stage IB2, IIA, or IIB Squamous Cervical Cancer: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.9985>
- Higgins, C. F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05630>
- Huerta-Yepey, S., Liu, H., Baritaki, S., Cebreira-Muñoz, M. D. L., Rivera-Pazos, C., Maldonado-Valenzuela, A., ... Bonavida, B. (2014). Overexpression of Yin Yang 1 in bone marrow-derived human multiple myeloma and its clinical significance. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2511>
- Huerta-Yepey, S., Vega, M., Escoto-Chavez, S. E., Murdock, B., Sakai, T., Baritaki, S., & Bonavida, B. (2009). Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.08.001>
- Jiménez-Morales, S., Hidalgo-Miranda, A., & Ramírez-Bello, J. (2017). Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.07.007>
- Khachigian, L. M. (2018). The Yin and Yang of YY1 in tumor growth and suppression. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.31255>
- Lam, V., Findley, H. W., Reed, J. C., Freedman, M. H., & Goldenberg, G. J. (2002). Comparison of DR5 and Fas expression levels relative to the chemosensitivity of acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia Research*. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(01\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(01)00162-X)
- Lassaletta Atienza, A. (2016). Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*.
- Lavanya, V., Adil, M., Ahmed, N., Rishi, A. K., & Jamal, S. (2014). Small molecule inhibitors as emerging cancer therapeutics. *Integr Cancer Sci Ther*.
- Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*. <https://doi.org/10.1016/S0959->

- López-Perez, T. V. Tirado-Rodríguez, B. Morales Martínez, M. Montecillo-Aguado, M. y Huerta-Yepez, S. 2021. Yin Yang 1 regulation of tumor cell resistance to chemoterapeutic drugs. En Bonavida, B. (eds). YY1 in the control of the pathogenesis and Drug resistance of cancer. A Critical Therapeutic Target. Elsevier, Academic Press, pp251-268
- Lozano, J. A. (2002). Oncología. Leucemias agudas. *Offarm*.
- Lum, B. L., Gosland, M. P., Kaubisch, S., & Sikic, B. I. (1993). Molecular Targets in Oncology: Implications of the Multidrug Resistance Gene. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1993.tb02695.x>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- Martínez-Torres, E., López-Pérez, T. V., Morales-Martínez, M., & Huerta-Yepez, S. (2020). Yin-yang-1 decreases fas-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia under hypoxic conditions: Its implications in immune evasion. *Boletín Medico Del Hospital Infantil de Mexico*. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000187>
- Mata, J. F., Silveira, V. S., Mateo, E. C., Cortez, M. A. A., Queiroz, R. G. P., Yunes, J. A., ... Scrideli, C. A. (2010). Low mRNA expression of the apoptosis-related genes CASP3, CASP8, and FAS is associated with low induction treatment response in childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Pediatric Blood and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/pbc.22463>
- Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., ... Galle, P. R. (1997). Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO- 1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI119174>

- Onciu, M. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009>
- Perez, E. A. (2009). Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0005-6>
- Pui, C. H., Campana, D., Pei, D., Bowman, W. P., Sandlund, J. T., Kaste, S. C., ... Relling, M. V. (2009). Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900386>
- Qu, S. Y., Sun, Y. Y., Li, Y. H., Xu, Z. M., & Fu, W. N. (2017). YY1 directly suppresses MYCT1 leading to laryngeal tumorigenesis and progress. *Cancer Medicine*. <https://doi.org/10.1002/cam4.1073>
- Ribera Santasusana, J. M. (2001). La citología óptica en el diagnóstico hematológico. *Medicina Clínica*.
- Ruiz Gómez, M. J., Souviron Rodríguez, A., & Martínez Morillo, M. (2002). La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *Anales de Medicina Interna*. <https://doi.org/10.4321/s0212-71992002000900011>
- Sánchez-Suárez, P., Luis Benítez-Bribiesca, Y., Benítez Bribiesca, L., & Sánchez Suárez, P. (2006). Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas. In *Cancerología*.
- Sánchez, M. A. O., Ortega, M. L. O., & Barrientos, J. V. R. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de Mexico*.
- Sarvagalla, S., Kolapalli, S. P., & Vallabhapurapu, S. (2019). The Two Sides of YY1 in Cancer: A Friend and a Foe. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01230>
- Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L. A. G., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F.,

- ... Steliarova-Foucher, E. (2017). International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30186-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30186-9)
- Sui, G., Affar, E. B., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N. R., Yin, P., ... Shi, Y. (2004). Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.004>
- Suminoe, A., Matsuzaki, A., Hattori, H., Koga, Y., Kinukawa, N., Ishii, E., & Hara, T. (2004). mRNA expression of apoptosis-associated genes in infant acute lymphoblastic leukemia: Low Fas expression is an independent predictor for poor prognosis [6]. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403228>
- Van Den Heuvel-Eibrink, M. M., Sonneveld, P., & Pieters, R. (2000). The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.5414/cpp38094>
- Wu, L., Xu, X., Shen, J., Xie, H., Yu, S., Liang, T., ... Zheng, S. (2007). MDR1 gene polymorphisms and risk of recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Journal of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1002/jso.20774>
- Wu, S., Kasim, V., Kano, M. R., Tanaka, S., Ohba, S., Miura, Y., ... Miyagishi, M. (2013). Transcription factor YY1 contributes to tumor growth by stabilizing hypoxia factor hif-1 α in a P53-independent manner. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0366>
- Xia, B., Li, H., Yang, S., Liu, T., & Lou, G. (2016). MiR-381 inhibits epithelial ovarian cancer malignancy via YY1 suppression. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4805-8>
- Zapata-Tarres, M., Juarez-Villegas, L. E., Maldonado-Valenzuela, A., Baay-Guzman, G. J., Lopez-Perez, T. V., Cabrera-Muñoz, L., ... Huerta-Yepez, S. (2019). Expression of YY1 in Wilms tumors with favorable histology is a risk factor for adverse outcomes. *Future Oncology*. <https://doi.org/10.2217/fon->

2018-0764

Zhang, Q., Stovall, D. B., Inoue, K., & Sui, G. (2011). The oncogenic role of Yin Yang. *Critical Reviews in Oncogenesis*. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v16.i3-4.30>

Zhao, G., Li, Q., Wang, A., & Jiao, J. (2015). YY1 regulates melanoma tumorigenesis through a MIR-9 ϵ - ϵ RYBP axis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0177-y>

Zhao, L., Li, R., & Gan, Y. H. (2018). Knockdown of Yin Yang 1 enhances anticancer effects of cisplatin through protein phosphatase 2A-mediated T308 dephosphorylation of AKT. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0774-8>