

**Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalpa**



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA MEDIADOS
POR EL EJE YY1-MDR1 EN CÉLULAS MADRE DE UNA LÍNEA CELULAR DE
CÁNCER DE PRÓSTATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Lic. en Biol. Exp. ANA BERTHA LÁZARO LIMÓN

TUTOR

Dra. SARA HUERTA YEPEZ

CO-TUTOR

Dra. LEONOR RODRÍGUEZ CRUZ

ASESOR

M. en C. GABRIELA ANTONIO ANDRÉS

MÉXICO D.F.,

ENERO, 2016

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 302366

Este proyecto fue aprobado por los comités de ética, bioseguridad e investigación y financiado con número (HIM/2014/039) por CONACYT, registro 2013-COI-202200

Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad

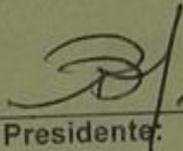
Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

**"EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA MEDIADOS
POR EL EJE YY1-MDR1 EN CÉLULAS MADRE DE UNA LÍNEA CELULAR DE
CÁNCER DE PRÓSTATA", que presentó:**

Lic. en Biol. Exp. Ana Bertha Lázaro Limón

El día 20 de enero del 2016.

Miembros del comité



Presidente:

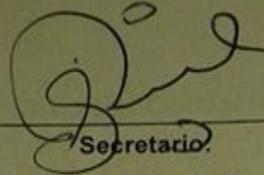
Dr. Pablo Damian Matsumura

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Tel (55)5804-4600, Ext. 2841; Fax (525)5804-4930



Secretario.

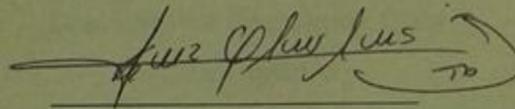
Dr. Rosendo Luria Pérez

Investigador en ciencias médicas D

Unidad de investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital infantil de México Federico Gómez

rluria77@gmail.com



Vocal 1:

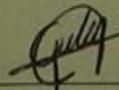
Dr. José Luis Gómez Olivares

Biología celular

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Tel: 58046593, gool@xanum.uam.mx



Vocal 2.

M. en C. Gabriela Antonio Andrés

Ayudante de investigación, Unidad de investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital infantil de México Federico Gómez

gabya_24@yahoo.com.mx

Miembros del Comité Tutorial

Dra. Sara Huerta Yopez

Co-directora

Jefa de la Unidad de investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital infantil de México Federico Gómez

shuertay@yahoo.com

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Co-directora

Investigadora en Lab. Biología Celular y Citometría de Flujo

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

leor@xanum.uam.mx

M. en C. Gabriela Antonio Andrés

Asesora

Ayudante de investigación, Unidad de investigación en Enfermedades Oncológicas

Hospital infantil de México Federico Gómez

gabya_24@yahoo.com.mx

DEDICATORIAS

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO PRINCIPALMENTE A MI PADRE TIMOTEO Y A MI MADRE MINERVA, POR SER LAS DOS PERSONAS MÁS IMPORTANTES EN MI VIDA. POR BRINDARME SU APOYO INDONCONDICIONAL, POR AGUANTARME EN

TODO MOMENTO DE DESESPERACIÓN, FRUSTACIÓN Y MAL HUMOR.

GRACIAS MAMI POR QUE SIEMPRE QUE LLEGABA A CASA CANSADA Y HAMBRIENTA, ME RECIBISTE CON COMIDA CALIENTITA Y UN “¿COMO TE FUE HIJA?”.

TAMBIÉN QUIERO DEDICARLE PARTE DE ESTE LOGRO A MIS DOS HERMANOS, A EDITH Y A CARLOS HAIRAN QUE SIEMPRE HAN AGUANTADO MI MAL HUMOR, ESPECIALMENTE CUANDO SE TRATO DE TAREAS Y MÁS.

POR ÚLTIMO TAMBIÉN DEDICO MI TRABAJO A UNA PERSONA QUE HA FORMADO PARTE DE MI VIDA DURANTE 9 AÑOS Y QUE A LO LARGO DE LA MAESTRÍA ME HA BRINDADO SU APOYO CON PALABRAS DE ALIENTO, SIEMPRE CON UN “ECHALE GANAS”, NO TE DESANIMES”, TU PUEDES, “SIGUE ADELANTE”, ETC. ESPECIALMENTE EN LOS PRIMEROS MESES EN QUE EMPEZE ESTE CAMINO. GRACIAS GABRIEL, POR ESTAR AHÍ PARA MÍ.

AGRADECIMIENTOS

ANTES QUE TODO, QUIERO AGRADECER A LA HERMOSA FAMILIA QUE TENGO, A MI PADRE Y A MI MADRE, POR HABERME APOYADO A LO LARGO DE TODA MI VIDA. AGRADEZCO A MI MADRE POR SER SIEMPRE MI APOYO DÍA A DÍA Y A MI PADRE POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO Y SER MI HOMBRE EJEMPLAR. AGRADEZCO A MIS DOS HERMANOS A EDITH Y A CARLOS.

TAMBIÉN QUIERO AGRADECER A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPLAPA, POR ABRIRME LAS PUERTAS DE ESTA GRAN UNIVERSIDAD.

LE DOY LAS GRACIAS EL POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL POR EL APOYO DE IMPRESIÓN DE TESIS.

AGRADEZCO A CADA UNO DE LOS PROFESORES QUE ME IMPARTIERON CLASE DURANTE ESTOS DOS AÑOS Y QUE FUERON CLAVE IMPORTANTE DE LO QUE HOY SOY.

QUIERO AGRADECE A LA Dra. SARA HUERTA YEPEZ POR ABRIRME LAS PUERTAS DE SU LABORATORIO Y HABERME ACEPTADO PARA FORMAR PARTE DE SU EQUIPO DE TRABAJO, MUCHAS GRACIAS.

AGRADEZCO A LA Dra. LEONOR RODRIGUEZ CRUZ POR HABERME BRINDADO SU APOYO Y FORMAR PARTE DE MI COMITÉ. POR ESTAR AL

PENDIENTE DE CADA UNA DE MIS DUDAS Y RESPONDER A ELLAS A LA
BREVEDAD. MUCHAS GRACAS.

AGRADEZCO A LA M. en C. GABRIELA ANTONIO ANDRES, POR SER MI
ASESORA Y BRINDARME SU APOYO, ASI COMO AGRADECER CADA CONSEJO
DADO.

ADEMÁS, QUIERO AGRADECER AL Dr. ROSENDO LURIA PEREZ POR EL
APOYO QUE ME BRINDO EN EL LABROTARIO Y EN LAS CLASES QUE ME
IMPARTIO.

QUIERO AGRADECER A CADA UNO DE LOS MIEMBROS DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS (UIEO) DEL HOSPITAL
INFANTIL DE MÉXICO, FEDERICO GÓMEZ, YA QUE CADA UNO DE ELLOS HIZO
ESTO POSIBLE.

LE DOY LAS GRACIAS A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO, A ESTEBAN,
EFREN, CARLITOS, ARMANDO, MARIO NEGRETTE, DANY CUETO, GABY,
BELEN, MARIANA, MÓNICA TORRES Y MÓNICA ARTEAGA.

POR ÚLTIMO LE DOY LAS GRACIAS A CADA UNO DE LOS MIEMBROS DEL
JURADO.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El cáncer de próstata es uno de los tipos de cáncer más común en la población masculina, y representa la segunda causa de muerte por cáncer en todo el mundo. La resistencia quimioterapéutica es una de las principales causas de la recaída en este y otros tipos de cáncer, en donde la proteína MDR1 (por sus siglas en inglés “multidrug resistance protein 1”), una bomba de expulsora de fármacos juega un papel importante. Debido a la importancia que ha cobrado esta proteína, nuestro grupo de trabajo previamente demostró que el factor de transcripción Yin-Yang 1 (YY1) regula de forma positiva la transcripción de MDR1; sin embargo, no hay estudios que demuestran el posible rol que desempeña la co-expresión de estas dos proteínas en las células troncales del cáncer, ya que su expresión se ha relacionado estar implicadas en la patogénesis del cáncer, así como en la quimiorresistencia. Por tal motivo en este trabajo, nos propusimos evaluar la expresión de YY1 y MDR1 en células con fenotipo troncal (CD44⁺, CD133⁺, CD24^{low}) y su posible implicación en la quimiorresistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS: Mediante citometría de flujo se identificó una población troncal con fenotipo CD44⁺, CD133⁺, CD24^{low} en la línea celular de cáncer de próstata (CaP) PC3, y posteriormente fue aislada mediante la técnica de “*Fluorescence-Activated Cell Sorting*”. Una vez obtenida la población de interés, se evaluó la expresión de YY1, MDR1 y SOX 2, así como su co-expresión. Por último, se analizó la viabilidad celular de células troncales cancerosas previamente tratadas

con un inhibidor de la actividad de YY1 (DETANONOate) o en combinación con una droga quimioterapéutica (Etoposido o Cisplatino).

RESULTADOS: Los resultados muestran claramente que en línea celular PC3 de CaP existe una población con fenotipo troncal, identificada con los marcadores de superficie celular ya reportados. Esta población presenta mayor expresión de YY1, MDR1 y SOX-2 en comparación con células de CaP con fenotipo no troncal. Además, las células con fenotipo troncal co-expresan niveles elevados de YY1 y MDR1. De manera interesante demostramos que la inhibición de YY1 en células con fenotipo troncal revierte la quimiorresistencia a etoposido y cisplatino.

CONCLUSION: Se identificó una población con fenotipo troncal en la línea celular PC3 que sobreexpresa y co-expresa YY1 y MDR1, los ensayos de la inhibición de YY1 en esta población sugieren, la participación de este factor de transcripción en los mecanismos de quimiorresistencia en las células con fenotipo troncal.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Prostate cancer is one of the main types of most common cancer in the male population, is the second leading cause of cancer death worldwide. Resistance to treatment with chemotherapeutic drugs is a major cause of relapse in this and other cancers, where MDR1 (multidrug resistance protein 1), a drug ejector pump plays an important role. Our working group previously showed that the transcription factor Yin Yang 1 (YY1) positively regulates transcription of MDR1. However, there is not studies demonstrating the possible role played by co-expression of these two proteins in cancer stem cells. In this paper, we proposed to evaluate the expression of MDR1 and YY1 with stem cell phenotype (CD44 +, CD133 +, CD24 low) and their possible role in chemoresistance

MATERIALS AND METHODS: The technique of flow cytometry was used to identify a cancer stem cell population phenotype CD44 +, CD133 +, CD24low in the PC3 cell line of prostate cancer (PCa), which was subsequently isolated by the technique of "Fluorescence-Activated Cell Sorting". Once we obtained our population, immunocytochemistry co-expression was performed to evaluate the expression of YY1, MDR1 and SOX 2 and. Finally, cell viability assays were performed using an inhibitor of the activity of YY1 (DETANONOate) alone or in combination with a chemotherapeutic drug (etoposide or cisplatin) a cells PCTP, PC3 and NO PCTC.

RESULTS: Our results clearly shown that in CaP cell line PC3 population there was a very low frequency population with stems phenotype, identified with the cell surface

markers as reported. This population has higher expression of YY1, MDR1 and SOX-2 as compared with PCa cells with no backbone phenotype. In addition, cells with stem phenotype co-express high levels of MDR1 and YY1. Interestingly demonstrate that inhibition of YY1 in cells with phenotype backbone reverses chemoresistance to etoposide and cisplatin.

CONCLUSION:

A population is identified with trunk phenotype in PC3 cell line that overexpressed and co-expressed YY1 and MDR1, tests of inhibition of YY1 in this population suggests the involvement of this transcription factor in the mechanisms of chemoresistance in cells with trunk phenotype

ABREVIATURAS

ABC: ATP binding cassette

CaP: cáncer de próstata

CSC: Cancer Stem Cell

CTC: Células troncales del cáncer

DAB: Diamino Bencidina

gp-170: glicoproteína 170 KDa

HRP: Peroxidasa de Rábano

MDR1: Multidrug Resistance Protein 1

MGMT: Enzima O6-metilguanina-ADN metiltransferasa

MTT: (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)

SCID: severe combined immunodeficiency

SOX-2: Sex determining region Y)-box 2

YY1: Yin Yang 1

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Fisiología de la próstata humana	1
Epidemiología del cáncer de próstata en México.....	3
Tratamientos en el cáncer de próstata.....	6
ANTECEDENTES.....	8
Resistencia a fármacos.....	8
Proteína MDR1	10
Mecanismo de acción de MDR1	12
El factor de transcripción YY1	13
Células Troncales del cáncer.....	14
Características de las CTC	15
Aislamiento e identificación de CTC.....	17
CTC y su resistencia a la quimioterapia.....	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Cultivo celular	22
Identificación de células troncales en cáncer de próstata.....	22
Purificación de CTC mediante FACS (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>).....	23
Elaboración de laminillas	23

Inmunocitoquímica	23
Doble inmunocitoquímica	24
Ensayo de viabilidad celular	25
Análisis bioinformático	26
RESULTADOS	27
1.- Identificación y aislamiento de células con fenotipo troncal	27
2.- Las CTC de CaP sobreexpresan YY1, MDR1 y SOX2	29
3.- Las CTC de CaP Co- expresan YY1 y MDR1	34
4.- La inhibición de YY1 induce a la reversión de la quimiorresistencia en CTC de CaP	36
5.- Expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con CaP	38
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

INTRODUCCIÓN

Fisiología de la próstata humana.

La próstata es un órgano del sistema reproductor masculino, se encuentra justo por debajo de la vejiga, rodeando a la uretra. Es una glándula mixta compuesta por una porción glandular, que normalmente ocupa dos terceras partes del tejido contenido dentro de la cápsula prostática, y el tercio restante es fibromuscular. La próstata humana normal es considerada un complejo glandular tubuloalveolar dividido en dos compartimentos: estromal y epitelial (**figura 1**). En los machos adultos, la glándula de la próstata contribuye a la producción de proteínas secretadas que están presentes en el fluido seminal (1).

De manera específica dentro del epitelio de la glándula prostática (**figura 2**), existen diferentes tipos celulares: células secretoras luminales, células basales, células intermedias y neuroendocrinas (2). Las células epiteliales luminales son las más numerosas, se encuentran diferenciadas y secretan antígeno prostático específico (teniendo como función la disolución del coágulo seminal) y fosfatasa ácida. También, estas células expresan elevadas cantidades del receptor de andrógenos (AR). Mientras que, las células epiteliales basales, están poco diferenciadas, no tienen actividad secretora, se encuentran distribuidas en la membrana basal, no expresan AR, su número es menor y expresan CD133, CD44, CK5, CD117.

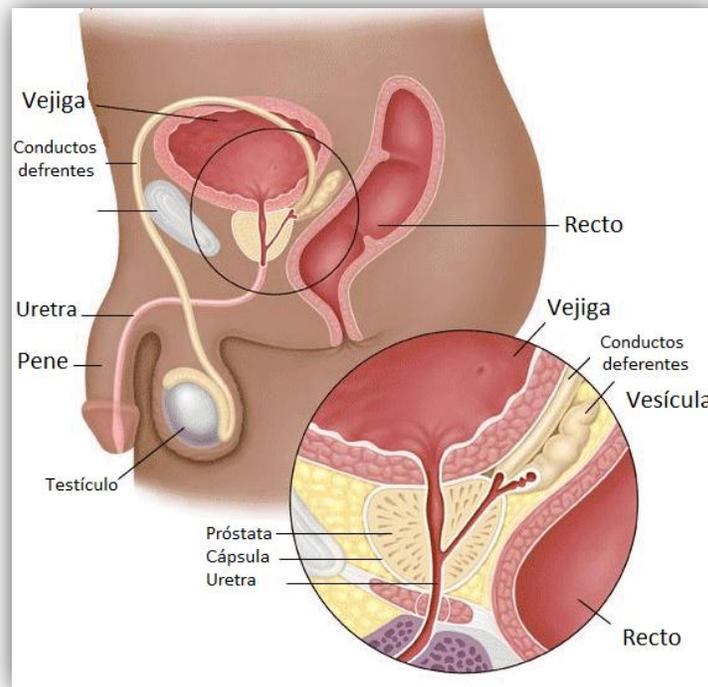


Figura 1. Esquema representativo de la próstata humana. Se encuentra ubicada delante del recto, debajo y a la salida de la vejiga urinaria. Tiene aproximadamente el tamaño de una nuez y está formada por dos lóbulos con los que rodea la uretra

Morfológicamente estas células se caracterizan por que son de un tamaño pequeño, con formas aplanadas o cuboides, con cromatina condensada y pequeño citoplasma.

Por último, las células neuroendocrinas se encuentran entre las células secretoras de los ductos y acinos del tejido normal, pertenecen al grupo de células APUD (amine precursor uptake and decarboxylation) y su función en la próstata es regular la actividad secretora y el crecimiento celular mediante la secreción de aminas (3). En estadios fisiológicos, esta variedad celular tiene un papel fundamental en el crecimiento, mantenimiento y proliferación celular a través de mecanismos paracrinos, y su importancia se incrementa en procesos patológicos específicos, como el cáncer, por lo que merecen consideraciones especiales para su estudio.

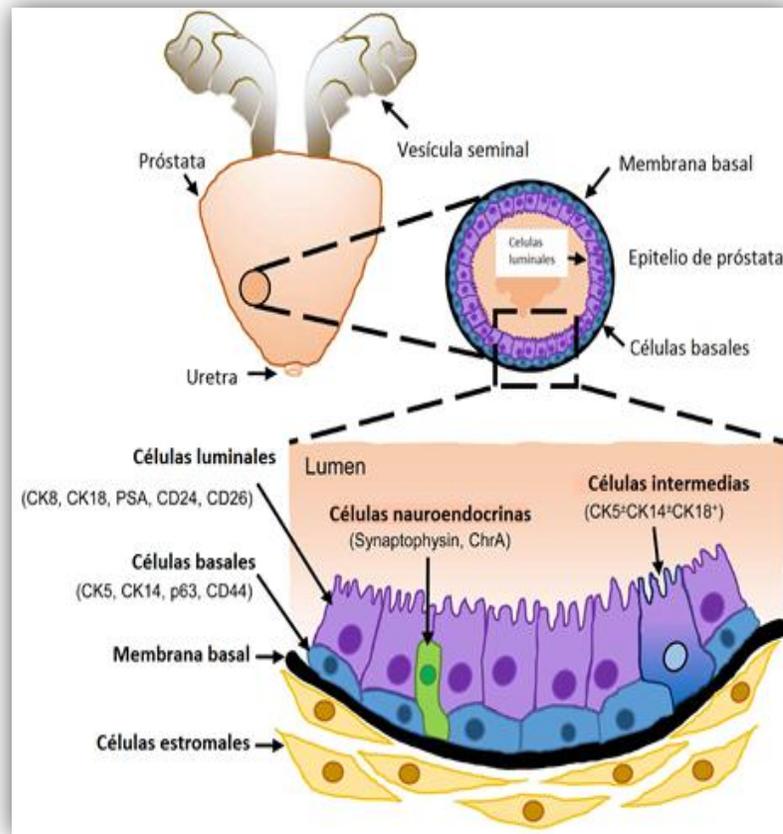


Figura 2.- Representación esquemática de la arquitectura celular del epitelio de la próstata humana. Consiste en una capa interna de células luminales secretoras. Las células basales forman una capa continua de células alrededor de las células luminales que están en contacto con la membrana basal. Células intermedias muestran basales y luminales marcadores, mientras que las células neuroendocrinas no comunes se encuentran dispersos por todo el epitelio. Los marcadores utilizados para distinguir cada tipo de células se indican entre paréntesis.

Epidemiología del cáncer de próstata en México.

En general el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México el panorama es muy parecido, se calcula que aproximadamente el 77% de las muertes son a causa de enfermedades no trasmisibles, las cuales se deben en su mayoría a causas por enfermedades cardiovasculares (24%), diabetes (14%),

cáncer (12%), y enfermedades respiratorias (6%) de acuerdo con datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Con respecto a las muertes por cáncer, durante el 2012 se estimaron 8.2 millones de muertes, de las cuales el 57% se presentaron en hombres y el 43% en mujeres en todo el mundo (4).

Dentro de las principales tipos de cáncer en orden decreciente son: mama, próstata, pulmón, colon y recto, y cérvico uterino con una gran diferencia entre los países desarrollados y en desarrollo (5). Es importante mencionar que la incidencia de estos tipos de cáncer van incrementando, lo que representa un gran problema de salud mundial.

El cáncer de próstata (CaP) es una de las principales enfermedades que afecta a la población masculina, no solo a nivel mundial sino de manera importante a nivel nacional. Además, es substancial señalar que dicha neoplasia representa la segunda causa principal de muertes relacionadas con el cáncer a nivel mundial (**Figura 3**). La mayoría de los CaP se clasifican como adenocarcinomas que se caracterizan por una ausencia de células basales y la proliferación incontrolada de células tumorales malignas con características de diferenciación luminal.

A pesar de que no existen datos actuales que nos muestren el estado de esta patología en nuestro país, datos publicados por Martínez-Sanchez y cols del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI, que muestran los principales tipos de cáncer hasta el 2013 en mujeres fueron: mama y cérvico uterino; en hombres: próstata, colon y recto.

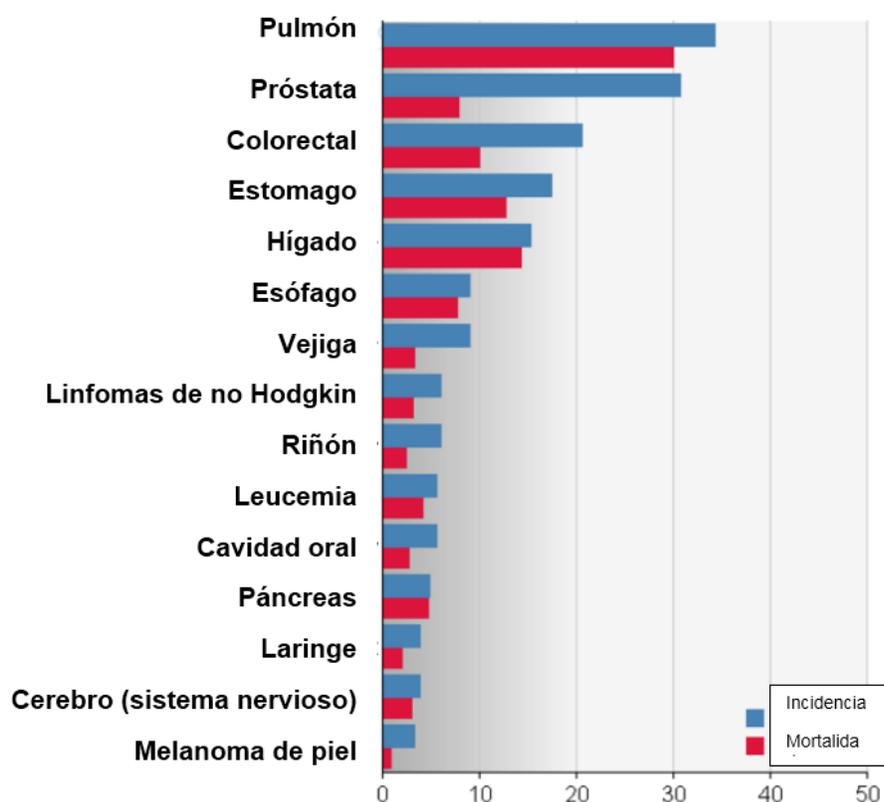


Figura 3.- Incidencia estimada, mortalidad y prevalencia en el mundo en el 2012. Tasa por 100000. GLOBOCAN 2012

La mayor frecuencia de cáncer se observó en mujeres (59.9%) comparada con los hombres (40.1%). La edad en la cual tanto los hombres y las mujeres pueden desarrollar esta enfermedad difiere entre uno y otro, ya que el cáncer en la mujer es más frecuente entre los 50 a 60 años, mientras que en el hombre es entre los 65 y 74 años (6).

Por otra parte, datos del instituto Nacional de cancerología (INCan) reportan que el cáncer de próstata es la neoplasia que se presenta con mayor frecuencia en los varones mayores de 50 años, en donde el grupo de edad más afectado son los hombres mayores de 65 años, de los cuales el 70% de los pacientes fallece por esta

causa, siendo una de las complicaciones frecuentes las metástasis óseas (7). Estos datos coinciden con el incremento del desarrollo de nuestro país, ya que el aumento en la esperanza de vida ha traído consigo el envejecimiento de la población y con ello un incremento de enfermedades crónico-degenerativas; entre ellas los tumores malignos.

En las primeras etapas de la enfermedad, el cáncer se limita a la próstata y no suele ser mortal; las acciones de detección oportuna son una herramienta valiosa que permite incorporar al paciente al tratamiento radical a tiempo, e impide la progresión de la enfermedad.

Tratamientos para el cáncer de próstata.

Existen diferentes tratamientos para los pacientes con CaP, el Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud en EE. UU. Indica que existen 7 tratamientos estándar para tratar esta enfermedad:

1. Espera cautelosa o vigilancia activa: debido a que el CaP progresa lentamente, algunos de los hombres no necesariamente tiene que ser sometidos a un tratamiento, sin embargo son tratados bajo un método llamado en observación o vigilancia activa. La primera trata de un seguimiento menos invasivo o intenso y se basa en cambios o síntomas en el paciente. En cuanto a la vigilancia activa se lleva acabo haciendo pruebas de PSA, exámenes digitales del recto o bien realizando ultrasonidos, todo esto para obtener información si el cáncer está creciendo.

2. Cirugía: en este caso se puede llevar a cabo una prostatectomía que consiste básicamente en la extirpación de toda la glándula prostática y algunos tejidos alrededor de esta con la finalidad de eliminar el cáncer.
3. Radioterapia: consiste en el empleo de rayos de alta energía o partículas para destruir las células cancerosas. A grandes rasgos existen dos tipos de radioterapia empleados para tratar el cáncer de próstata: la radioterapia con haces externos y la braquiterapia o bien llamada radiación interna.
4. Terapia con hormonas: este tipo de terapia es también conocida como supresión de andrógenos, la cual consiste en reducir los niveles de hormonas masculinas, básicamente reduciendo los niveles de andrógenos, en los cuales se incluye la testosterona, evitando que estos andrógenos tengan un efecto sobre las células cancerosas. Es importante mencionar que este tipo de terapia se emplea en aquellos hombres que no pueden ser tratados con radioterapia o bien que no pueden ser sometidos a cirugía.
5. Quimioterapia: este tipo de tratamiento se basa en el empleo del uso de medicamentos, lo cuales pueden ser inyectados vía intravenosa o bien administrarse en forma de pastilla vía oral, con la finalidad de eliminar a las células cancerosas. Se emplea este tipo de estrategia cuando el cáncer de próstata se ha propagado fuera de la glándula prostática y la terapia hormonal ya no es eficaz.

6. Terapia biológica: este tipo de terapia consiste en el empleo de vacunas para este tipo de cáncer. Un ejemplo es Sipuleucel-T (Provenge®) que se usa para tratar el cáncer de próstata avanzado. Esta vacuna se produce de manera especial a partir de las propias células sanguíneas de cada paciente.
7. Terapia con bisfosfonatos: este tipo de terapia se emplea cuando el cáncer se ha propagado a los huesos causando dolor y otros problemas, tal como huesos fracturados o altos niveles de calcio en la sangre. Para ello, se emplea medicamentos para proteger a los huesos que incluye bifosfonatos o Denosumab (Xgeva®)

En general esta gama de tratamientos se ofrece a los pacientes dependiendo del estadio de la enfermedad. Sin embargo, no todos los pacientes tienen éxito con la terapia empleada, en particular aquellos pacientes que se encuentran en el estadio IV. Por lo que continúa siendo de gran interés el estudio de los mecanismos implicados en la quimiorresistencia.

ANTECEDENTES

Resistencia a fármacos

El empleo de quimioterapéuticos se lleva a cabo cuando el CaP se ha propagado fuera de la glándula prostática y la terapia hormonal ya no es eficaz. Solamente se utiliza en casos específicos, no es un tratamiento convencional para el cáncer de

próstata en etapas tempranas. Por lo general, los medicamentos de quimioterapia se usan uno a la vez. Algunos de los medicamentos quimioterapéuticos que se utilizan para tratar el CaP incluye: Docetaxel (Taxotere®), Cabazitaxel (Jevtana®), Mitoxantrona (Novantrone®), Estramustina (Emcyt®), Doxorubicina (Adriamycin®), Etopósido (VP-16), Vinblastina (Velban®), Paclitaxel (Taxol®) y Carboplatino (Paraplatin®).

La quimioterapia es el tratamiento principal para hacer frente al CaP metastásico. Desafortunadamente, el CaP es resistente a una amplia gama de agentes antineoplásicos, un fenómeno conocido como resistencia a múltiples fármacos (MDR) que desempeña un papel importante en el fenotipo resistente observado en esta neoplasia (8). La quimiorresistencia es una gran limitante para el éxito del tratamiento de muchos tipos de cáncer, en donde hasta ahora, el mecanismo y el marcador predictivo para la quimiorresistencia son poco conocidos.

Es importante mencionar que los pacientes con CaP localizado tienen una excelente supervivencia a largo plazo y con alta tasa de cura con tratamientos estándar, tales como la resección quirúrgica y la radioterapia. Sin embargo, los pacientes con avanzada enfermedad metastásica a menudo están asociados con un mal pronóstico, y hasta 30% de los pacientes tratados sufre recaída y sobre expresa antígeno prostático específico (PSA) dentro de los 18 meses después de la resección quirúrgica (9), aunque algunos de los pacientes en la etapa temprana inicialmente responder a la terapia hormonal, la mayoría de los paciente invariablemente desarrollan carcinoma de próstata resistente a la castración (CRPC) y, finalmente,

mueren a causa de enfermedad secundaria (metástasis). Por lo tanto, la continuidad del mismo tratamiento tiene pocas probabilidades de éxito y en estos casos las opciones terapéuticas son pocas y se puede anticipar que los resultados serán poco favorables.

Son diversos los mecanismos implicados en la resistencia a fármacos, en los que se incluyen factores farmacológicos: baja dosis del agente quimioterapéutico, el ritmo inapropiado de la infusión, ruta inadecuada de la administración, y velocidad del metabolismo del fármaco. También se encuentra factores celulares: variaciones en secuencia de genes que codifican para enzimas que metabolizan fármacos, alteración en la vía de apoptosis, alteración en la señalización celular, alteración de vías de supervivencia celular, y sobre expresión de proteínas expulsoras de fármacos en las cuales se incluye la sobre expresión de la proteína MDR1.

Proteína MDR1

Entre los mecanismos que participan en la resistencia a la quimioterapia, se encuentran la reducción de la acumulación de los fármacos en la célula, mediado por la participación de proteínas como la glicoproteína P, también conocida como gp-170 o MDR1, un transportador ABC (ATP binding cassette) que utilizan energía de la hidrólisis del ATP para disminuir los niveles citoplasmáticos de sus sustratos. Es una proteína fosforilada y glicosilada de 170 kDa de 1280 aminoácidos, es codificada por el gen *mdr1* (10) . Presenta dos zonas de unión al ATP ubicadas en su dominio citoplásmico, un sitio de glicosilación entre el primero y el segundo dominio transmembranal y varios sitios de fosforilación (11).

MDR1 o bien gp-170 se expresa como una sola cadena polipeptídica que contiene dos porciones homologas de longitud similar, por esto se podría decir que MDR1 es un dímero que se localiza en la membrana celular principalmente. Esta proteína consta de 12 regiones transmembranales, de 6 asas extra celulares y dos regiones

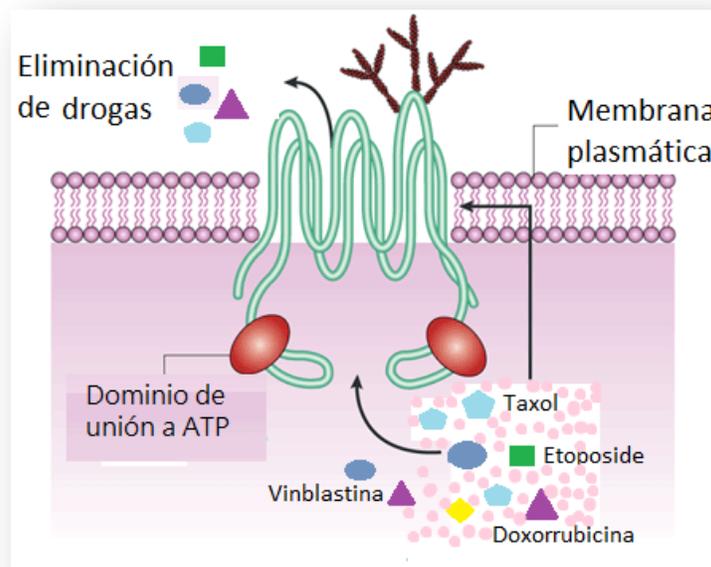


Figura 4.- Representación esquemática de gp-170 (MDR1). Proteína implicada en la quimiorresistencia, consta de 12 regiones transmembranales, dos regiones de unión a ATP citoplasmáticas y una región glicosilada entre el segundo y primer dominio transmembranal. Mediante la hidrólisis de ATP, gp-170 elimina del interior de la celular una serie de sustratos que van desde alcaloides de la vinca, antraciclinas mitoxantronas, taxanos, entre algunos otros más.

citoplasmáticos de unión a ATP (**figura 4**). Las regiones de unión a ATP se encuentran cerca de la región N-terminal, mientras que la segunda región de unión adenin trifosfato se localiza en la región C-terminal, ambos dominios localizados en la región citoplasmática. Ejemplos de sustratos de esta proteína que induce disminución de los niveles de intracelulares son antraciclinas, mitoxantronas,

taxanos, epipodofilotoxina, vincristina, desorribicina, entre otros fármacos (13) representando una de las principales causas de falla al tratamiento quimioterapéutico.

Mecanismo de acción de MDR1

MDR1 actúa como una bomba expulsora aunque no es aún un mecanismo conocido totalmente. Se especula que las drogas pasan a través de un poro hidrofóbico formado por un dominio transmembranal, donde la expulsión de sustancias requiere de un cambio conformacional de la proteína dependiente de ATP. Se ha sugerido que el estado de fosforilación de MDR1 puede regular este proceso y modular la resistencia a citotóxicos. Además se han reportado varios tipos de tumores donde MDR1 se encuentra sobre-expresado y muestran resistencia a fármacos (14). Sumado a estos reportes, existen una variedad de evidencias en donde claramente se asocia la sobre expresión de esta proteína transportadora de citotóxicos con la progresión del CaP, en un ejemplo claro se demostró que la hipermetilación CpG del gen MDR1 contribuye a la patogénesis y progresión en este tipo de cáncer (15). Además, en otro estudio se demostró que la expresión de MDR1 por inmunocitoquímica en 96 pacientes con CaP y 20 pacientes con hipertrofia prostática benigna, se correlaciona con el grado del tumor, estadio, y los niveles de antígeno prostático específico, lo que indica la posible importancia de esta proteína en la recurrencia del cáncer de próstata (16). Debido a que ha tomado una gran importancia en los mecanismos de quimiorresistencia, diversos grupos han tratado

de evidenciar que procesos celulares están regulando la actividad y expresión de esta proteína.

De manera específica, se ha reportado que la expresión de gen *mdr1* puede ser regulada por diferentes factores de transcripción como: Nrf2, E2F, HIF-1 α y recientemente nuestro grupo de trabajo ha reportado que el factor de transcripción YY1 regula de manera positiva su transcripción (17-19).

El factor de transcripción YY1

Yin Yang 1 (YY1) es un factor de transcripción que consta de cinco exones altamente conservados que codifica una proteína de 414 aminoácidos con una masa molecular de 44 kDa. En el ser humano, el gen de YY1 produce ocho transcritos diferentes (a-h) generados por “splicing” alternativo, que codifican ocho isoformas diferentes. Es un factor de transcripción ubicuo y multifuncional con dedos de zinc, miembro de la familia del grupo de proteínas Polycomb, un grupo de receptores con una caja homeótica, implicados en múltiples procesos celulares y que juegan un papel en la hematopoyesis y en el control del ciclo celular (20). Este factor de transcripción se calcula puede regular la transcripción del 8% de los genes de mamíferos, en consecuencia, juega un papel fundamental, tanto en procesos biológicos normales como lo es la embriogénesis, diferenciación, replicación, proliferación celular, diferenciación de células B, así como en los mecanismos de carcinogénesis y progresión tumoral (21). Los mecanismo de represión de la transcripción que desarrolla pueden ser: uniéndose competitivamente a sitios de activadores de

transcripción, desplazando al activador; interfiere con la función del activador que permanece unido a su promotor: Como activador de la transcripción puede funcionar mediante interacciones físicas proteína/proteína y la unión directa a regiones promotoras (22).

Se ha demostrado que YY1, además de participar en procesos biológicos normales, puede actuar como disparador de carcinogénesis como resultando del aumento en su expresión o activación en varias neoplasias: linfomas (23), melanoma (24), tiroides (25) entre otras. Claramente se ha involucrado la relación entre YY1, la resistencia y el crecimiento del tumor en CaP (26), así como en su patogénesis (27).

Es claro el papel que desempeña el factor de transcripción YY1 en diferentes tipos de cáncer incluyendo el CaP, además como ya se mencionó anteriormente se ha demostrado de manera importante un nuevo papel de YY1 al regular transcripcionalmente de forma positiva el gen *mdr1*, con lo que se demuestra su participación en procesos de quimiorresistencia mediados por MDR1.

En los últimos años se ha implicado una población celular dentro de los tumores como posible responsable de los procesos de quimiorresistencia, progresión tumoral e invasividad (28). Dicha población es llamada células madre del cáncer (CSC) o bien células troncales del cáncer (CTC)

Células Troncales del cáncer

Trabajos recientes han identificado una población única de células cancerosas con propiedades troncales en un número creciente de tumores malignos. Su biología ha

inspirado la hipótesis de las células troncales cancerosas (CTC), que predice una estructura tumoral de alta complejidad y heterogeneidad, en la cual el crecimiento tumoral es sostenido por células altamente proliferativas provenientes de una población conspicua de células indiferenciadas, de baja actividad metabólica y mayormente quiescentes. Se ha sugerido que las CTC son responsables del origen y la reconstitución intermitente del tumor en algunos tipos de cáncer, incluyendo próstata, leucemia mieloblástica aguda, cáncer de mama, cáncer de cerebro, pulmón, ovario e hígado (29).

El descubrimiento de las CTC en tumores sólidos ha cambiado el panorama de la carcinogénesis y la quimioterapia. Por tanto, su precisa identificación y el estudio de su biología constituyen hoy en día una prioridad del mundo biomédico, enfocada en su exploración como un blanco celular de intervención terapéutica.

Características de las CTC

La definición fue ampliamente aceptada debido a que una única célula posee la capacidad de auto-renovación y de generar los linajes heterogéneos de células cancerosas que conforman el tumor (**figura 5**) (30). Esta pequeña subpoblación (<1%) de las células de cáncer en general, tienen la capacidad de proliferar extensamente y formar un nuevo tumor, que son el componente fundamental que conduce a la recurrencia del tumor, la resistencia a la terapia, y metástasis. Las CTC pueden someterse a una simétrica división celular en dos hijas idénticas CTC o en división celular asimétrica en una hija CTC y una célula progenitora diferenciada, lo

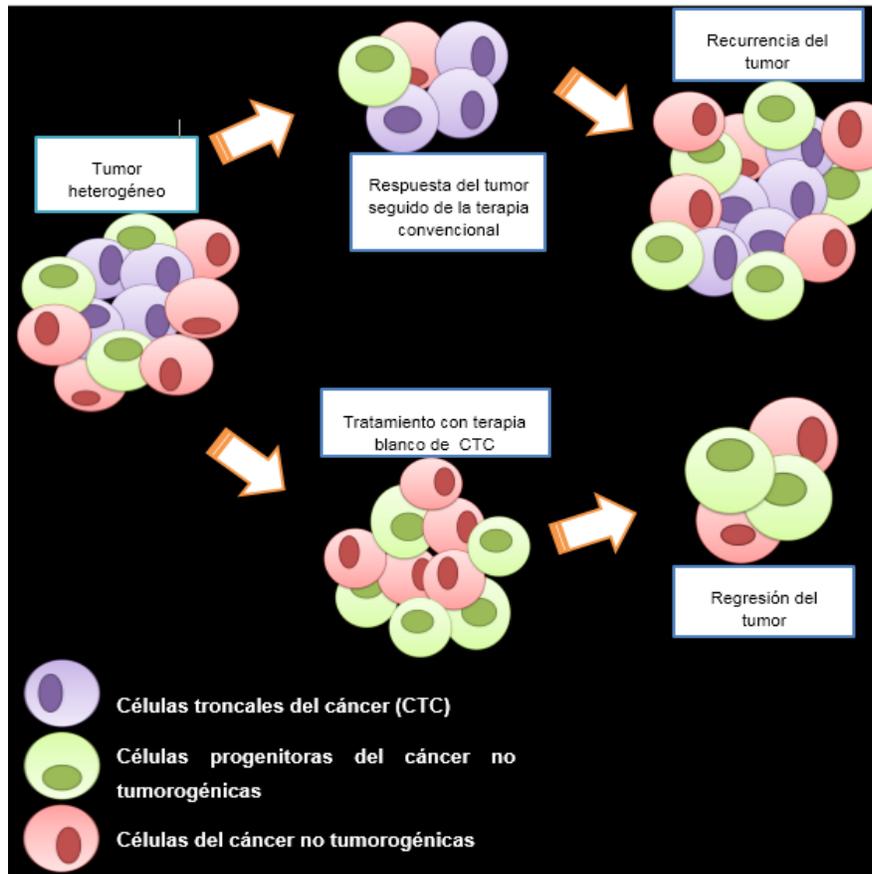


Figura 5.- Esquema representativo de la hipótesis de las CTC. Se postula que el crecimiento tumoral es impulsado por una subpoblación de células cancerosas proliferan y se auto-renuevan. CTC también son multipotentes y puede dar lugar a la diversidad de un conjunto de células que forman un tumor determinado. Inherente dentro de esta hipótesis es la suposición de que los tratamientos actuales para el cáncer pueden disminuir considerablemente la carga tumoral, pero tienen un efecto disminuido en CTC, que más tarde conducen a la recurrencia del tumor y el nuevo crecimiento.

que resulta en el crecimiento y expansión del tumor por el incremento del número de células madre. Las CTC no son sinónimo de las células madre normales, las CTC difieren significativamente de las células madre normales de su actividad tumorigénica. Pueden formar tumores cuando se trasplantan en animales SCID, mientras que las células madre normales no pueden (31).

Las CTC, pueden distinguirse por cuatro características principales (32): 1.- Auto-renovación: la subpoblación CTC puede ser trasplantado en una serie secuencial de múltiples generaciones, lo que indica la capacidad de auto-renovación. 2.- Diferenciación: las CTC pluripotentes no sólo pueden formar CTC hijas tumorigénicas por la división celular simétrica, sino también pueden generar poblaciones en masa de células no tumorigénicas por la división celular asimétrica. 3.- Tumorigenicidad: una pequeña subpoblación de células troncales cancerosas tienen un potencial tumorigénico cuando se trasplantan en animales. 4.- Marcadores de superficie específica: la subpoblación de células madre cancerosa se puede separar de las células no troncales por marcadores específicos, por ejemplo para el CaP se han identificado marcadores de superficie celular como CD44⁺ y CD133⁺.

Aislamiento e identificación de CTC

El aislamiento e identificación de las CTC en los tejidos tumorales sólidos y en líneas celulares se lleva a cabo por diferentes métodos ayudando como una herramienta de gran importancia para la investigación de la iniciación, el desarrollo, diagnóstico y terapéutica de los tumores. Se puede utilizar las propiedades de células troncales, como la expresión de marcadores de superficie específicos, capacidad de formación de esfera en medio no adherente, capacidad de exclusión del colorante Hoechst 33342, expresión de marcadores específicos de superficie celular, vías de señalización intracelular, así como la actividad de la enzima aldehído dehydrogenase1 (ALDH1), son blancos para aislar a CTC (33, 34).

CTC y su resistencia a la quimioterapia

Una explicación del por qué la quimioterapia falla para curar el cáncer, se puede responder en parte con la hipótesis en la cual las CTC podrían ser las responsables de la resistencia a antineoplásicos. Esta hipótesis se explica en parte por las diferentes características que poseen. Una de las principales, es la presencia de altos niveles de expresión de proteínas ABC (ATP binding cassette), la resistencia contra la apoptosis, capacidad de reparación del ADN, y una lenta tasa de auto-renovación (32).

Estudios en células cancerosas han puesto en manifiesto que las CTC comúnmente expresan altos niveles de bombas expulsoras de fármacos, en donde, estas bombas expulsoras son responsables de proteger a las CTC de los daños causado por las quimioterapia. Dicha protección se da a través del mecanismos de bombeo conduciendo a la disminución de la acumulación del fármaco en las células tumorales, alterado la distribución intracelular, el aumento de desintoxicación, y desacoplado la vía de apoptosis (35). Por lo tanto, como resultado de estas propiedades biológicas, las CTC se vuelven resistentes a los agentes quimioterapéuticos y por ende sobreviven a la acción de los fármacos. Además de poseer una mayor capacidad de expulsión de agentes citotóxicos, las CTC se identifican por su característica de lento ciclos celulares y propiedades de reposo (31).

Por otro lado las CTC producen una población de células tumorales que reparan su DNA, lo que conduce a que aun cuando queden cantidades mínimas de fármaco en el interior celular, este no tiene efecto alguno y podría explicarse debido a que las células CD133+ expresan 30 veces más los niveles de enzima de reparación del ADN O6-metilguanina- DNA metiltransferasa (MGMT) (36). Estudios específicos en pacientes con altos niveles de expresión de MGMT, muestran reducción significativa de supervivencia en comparación con los pacientes con baja expresión de MGMT (37). En adición a estos mecanismos de resistencia a fármacos en las CTC, uno más de los mecanismos de resistencia a drogas es la presencia de ALDH la cual es una enzimas dependientes de NADP + tetramérica que oxida aldehídos a ácidos carboxílicos y permite a las células resistir el estrés oxidativo (38). La alta expresión de ALDH está bien demostrado estar implicada en la resistencia a drogas convencionales citotóxicas como ciclofosfamida, doxorubicina, cisplatino (39).

La posibilidad de que las CTC no se eliminen debido a sus propiedades intrínsecas o adquiridas, como quiescencia, habilidad para reparar DNA dañado, sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas y de multirresistencia a drogas (MDR), pueden proteger a dichas células troncales tumorales de las terapias anti-neoplásicas (40), representando un gran problema a la terapia. Por tal motivo el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia a la quimioterapia en las CTC en CaP son de suma importancia en la búsqueda de nuevos y/o mejores tratamientos contra el cáncer.

JUSTIFICACIÓN

El CaP es un tipo de cáncer que afecta al sexo masculino, siendo la segunda causa de muerte en el mundo. A pesar del éxito en los esquemas de tratamiento, alrededor del 30% de los pacientes desarrolla quimiorresistencia a los agentes antineoplásicos y las opciones terapéuticas se tornan limitadas. Por esta razón es de gran importancia continuar con investigaciones que nos permitan conocer más acerca de los mecanismos de resistencia a la quimioterapia en esta enfermedad.

Recientemente se evidenció que el factor de transcripción YY1 regula de manera positiva la expresión de la proteína de multiresistencia a drogas MDR1 y que la expresión elevada de YY1 se correlaciona con la agresividad e invasividad en el cáncer de próstata. Además, se ha demostrado la presencia de células madre tumorales en diferentes tipos de tumores malignos que sobre expresan MDR1, siendo una de sus características principales. Por lo que resulta interesante evaluar el papel de YY1 en la regulación de la expresión de MDR1 en este tipo de células.

No existen estudios en donde se evalúe YY1/MDR1 en modelos de cáncer de próstata y su participación en los mecanismos de quimioresistencia en CTC. Por lo que su análisis nos ayudaría a comprender mejor el papel de esta vía en los mecanismos de resistencia a drogas y entender el comportamiento de esta y otro tipo de neoplasias, así como avanzar en los conocimientos disponibles para en el futuro desarrollo de nuevos y/o mejor factores pronósticos y blancos terapéuticos.

HIPÓTESIS

Si YY1 regula de manera positiva la expresión del gen *mdr1*, su inhibición provoca la disminución de la expresión de la proteína MDR1 en CTC de CaP y, al mismo tiempo disminuye su resistencia a la actividad de fármacos antineoplásicos, entonces el factor YY1 estará implicado en la resistencia a la quimioterapia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las CTC en la quimiorresistencia, mediada por YY1-MDR1 en el cáncer de próstata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar y aislar células de fenotipo troncal de una línea celular de cáncer de próstata PC3.
2. Evaluar la correlación de la expresión de MDR1 y YY1 en CTC derivadas de PC3.
3. Evaluar el efecto de la inhibición de YY1 en la quimiorresistencia en CTC derivadas de PC3.
4. Evaluar la correlación entre YY1 y MDR1 en pacientes con cáncer de próstata mediante un análisis bioinformático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular PC3 derivada de un paciente con CaP se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivó a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ en medio RPMI-1640 (Gibco / Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 3% de suero bovino fetal (Gibco®, ThermoFisher scientific), 2 mM L-glutamina, y 1% de penicilina-estreptomicina. Las células se pasaron cada 3 a 5 días al llegar a 80% se empleó Tripsina-EDTA 0.05% (Gibco ThermoFisher Scientific) para despegar a las células de confluencia.

Se utilizó donador de óxido nítrico DETANONOate para inhibir a YY1 y fue obtenido de Enzo, Life Sciences. Además de que fueron tratadas con Cisplatino (Sigma, Life Science) y etoposide (Sigma-Aldrich).

Identificación de células troncales en cáncer de próstata.

Para la identificación de las CTC se cultivó de la línea celular PC3 como ya se mencionó anteriormente. Las células fueron cosechadas y bloqueadas con PBS al 50% SBF por 15 min, posteriormente fueron lavadas con PBS al 3% SBF y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Enseguida se sometieron a tinción multicolor con CD44-FITC (BD Pharmingen™), CD133-APC (Miltenlyi Biotec) y CD24-PE (BD Pharmingen™). La fracción de células troncales fue identificada como CD44⁺, CD133⁺ y CD24^{low} mediante cartometría de flujo multiparamétrica utilizando un citómetro CyAn™ ADP Analyzer, *Beckman Coulter*.

Purificación de CTC mediante FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

Para aislar y obtener la población de CTC de células PC3, las células fueron cosechadas y teñidas como en el paso anterior. Posteriormente fueron cosechadas utilizando EDTA 3mM, bloqueadas con PBS al 50% SBF por 15min y fueron lavadas con PBS al 3% SBF a 1500 rpm por 5min. Enseguida se sometieron a tinción multicolor con CD44-FITC, CD133-APC y CD24-PE por media hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, las células se lavaron con PBS 3% SBF, y fueron resuspendidas y filtradas. La clasificación las células de interés se llevó a cabo utilizando BD FACS Aria™ IIu, definiendo una subpoblación CD133^{high}/CD44^{high} que se tomó como CTC.

Elaboración de laminillas

Se elaboraron laminillas para inmunocitoquímica y doble inmunocitoquímica de células PC3, PC3 sorteadas con fenotipo troncal (PCTC) y células PC3 sorteadas que no tenían fenotipo troncal (NO PCTC). El número de células para cada población fueron determinadas utilizando un contador de células (Automated Cell Counter-BioRad). Se colocaron de 5000 células por spot en la minillas de vidrio esmeriladas. La preparación se dejó secar a temperatura ambiente, una vez seca las laminillas fueron sumergidas en paraformaldehído al 4% por 20 minutos a 4°C. Por último, fueron lavadas dos veces con PBS y almacenadas hasta su uso.

Inmunocitoquímica

Se empleó la técnica de inmunocitoquímica para evaluar la expresión de las proteínas YY1, MDR1 y SOX-2 utilizando anticuerpos específicos. Brevemente, las

laminillas se colocaron en una solución reguladora de citrato de sodio 0.01M y se incubaron en baño maría durante 15 min a 90°C, posteriormente se bloquearon los receptores Fc con suero normal de cerdo durante 1h y se agregaron los anticuerpos de interés, anti-MDR1 (Abcam^R, *discover more*), anti-YY1 (Novus Biologicals) y anti-Sox-2 (Abcam^R, *discover more*). Las preparaciones se incubaron toda la noche a 4 °C en cámara húmeda con el anticuerpo primario. Se utilizaron controles de isotipo según correspondía, como anticuerpo secundario se utilizó el Kit universal biotinilado (Dako) y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HPR) (Dako). El color generado mediante la adición del sustrato diamino bencidina (DAB) durante 1 a 2 minutos fue detenida con agua de la llave, enseguida se realizó la contra tinción con hematoxilina. Finalmente, las células fueron deshidratadas bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Se cubrieron con resina y un cubre objetos.

Doble inmunocitoquímica

Brevemente, las células fueron colocadas en una solución reguladora de citrato de sodio 0.01M e incubadas en baño maría durante 15min a 90°C, posteriormente se bloquearon los receptores Fc con leche en polvo durante 1hora. Enseguida, se colocó el anticuerpo primario anti-MDR1 (Abcam^R, *discover more*) a una dilución 1:2500, dejándose incubar toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados con TBS cada uno de 8 min, se colocó el anticuerpo secundario (Dako) y se incubo por media hora, después se realizaron 3 lavados con TBS por 5

min y se colocó la streptavidina (Dako). A continuación se procedió al revelado, utilizando (*ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit*, Ventana Medical Systems, Inc.) de acuerdo al fabricante, 4 minutos de Enhancer, 8 minutos de una mezcla entre Fast Red A y Naftol enseguida 8 minutos de Fast Red B. Al terminar el revelado se enjugaron las laminillas con agua de la llave para detener la reacción y en seguida las células fueron bloqueadas con SBF al 2% por una hora, al terminar el bloqueo se adiciono anti-YY1 (Abnova) 1:1500 dejándose incubar por toda la noche en cámara húmeda. Al día siguiente se colocó el anticuerpo secundario Link Universal (Dako) dejándose incubar por media hora, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y se adiciono streptavidina (Dako). Finalmente se revelo utilizando el Kit (Liquid DAB + substate Cromogen System, Dako) 1:30 minutos deteniendo la reacción con agua de la llave y contra tiñendo con verde de malaquita.

Ensayo de viabilidad celular

Las CTC, y negativas a los marcadores de troncalidad, así como las células PC3 fueron depositadas en una placa de 96 pozos a una densidad celular de aproximadamente 1300/pozo incubándolas durante toda la noche. Al día siguiente, el medio se retiró y medio fresco suplementado con DETANONOate (Enzo, Life Sciences) a 250 μ M fue añadido por 18 horas. Nuevamente se retiró el medio y se adiciono medio fresco con CDDP (Sigma, Life Science) a una concentración de 3 μ M durante 24 horas. Las células control recibieron medio fresco sin tratamientos, dos pozos fueron preparados para cada grupo. Después de 24 horas de incubación a 37

° C en 5% de CO₂, la viabilidad celular se determinó mediante el kit de ensayo de viabilidad celular MTT de Roche acorde con las instrucciones del fabricante. A continuación, la absorbancia se midió un multilector de placas con EnSpire Multimode plate Reader, PerKinElmer, versión 4.13.3005.1482. El valor de IC₅₀, definida como la concentración de fármaco requerida para reducir la supervivencia celular a 50%, fue determinada por la absorbancia relativa de MTT, utilizando la siguiente formula: % de viabilidad = (OD (tratamiento) / OD (control)) x 100.

Análisis bioinformático

El Metaperfil comparativo de la expresión de cDNA, se realizó a partir de una base de datos Premium Oncomine (Oncomine™ Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI, USA) fue utilizada para el análisis y visualización del análisis bioinformático (www.oncomine.com). El análisis de la expresión diferencial de YY1 y MDR1 en base de datos existentes de microarreglos de cáncer de próstata fue analizando un valor umbral para la clasificación de genes al 10%.

Procesamiento de los datos

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa Prisma para Windows ver. 5. Se llevó a cabo la estadística descriptiva de los datos generales de los grupos formados. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas y error estándar. Se utilizaron pruebas no paramétricas para establecer

si existen diferencias de la proporción de células positivas. $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

1.- Identificación y aislamiento de células con fenotipo troncal

1.1.- Identificación de una población con fenotipo troncal en la línea celular PC3.

Para asegurarnos que en la línea celular PC3 existe una población con fenotipo troncal, se cultivaron células PC3 y posteriormente se cosecharon y analizaron por medio de la técnica de Citometría de flujo. La población celular identificada se encontró en muy baja frecuencia. Como ya habíamos comentado la identificación celular se llevó a cabo utilizando anticuerpos dirigidos contra CD44, CD133, y CD24 (**figura 6**). El resultado de este experimento mostró que la presencia de células con fenotipo troncal varía de 0.102 a 0.216 % del total de la población celular viable, que es positiva para los marcadores que ya se han reportados en la literatura para su aislamiento e identificación (41, 42). Las células con este fenotipo están contenidas en un compartimiento celular $CD44^+$, $CD133^+$ y $CD24^{low}$. En la **figura 6** puede observar los resultados de tres experimentos independientes de la identificación de células positivas a los marcadores mencionados anteriormente para la identificación e aislamiento de las células con fenotipo troncal en CaP.

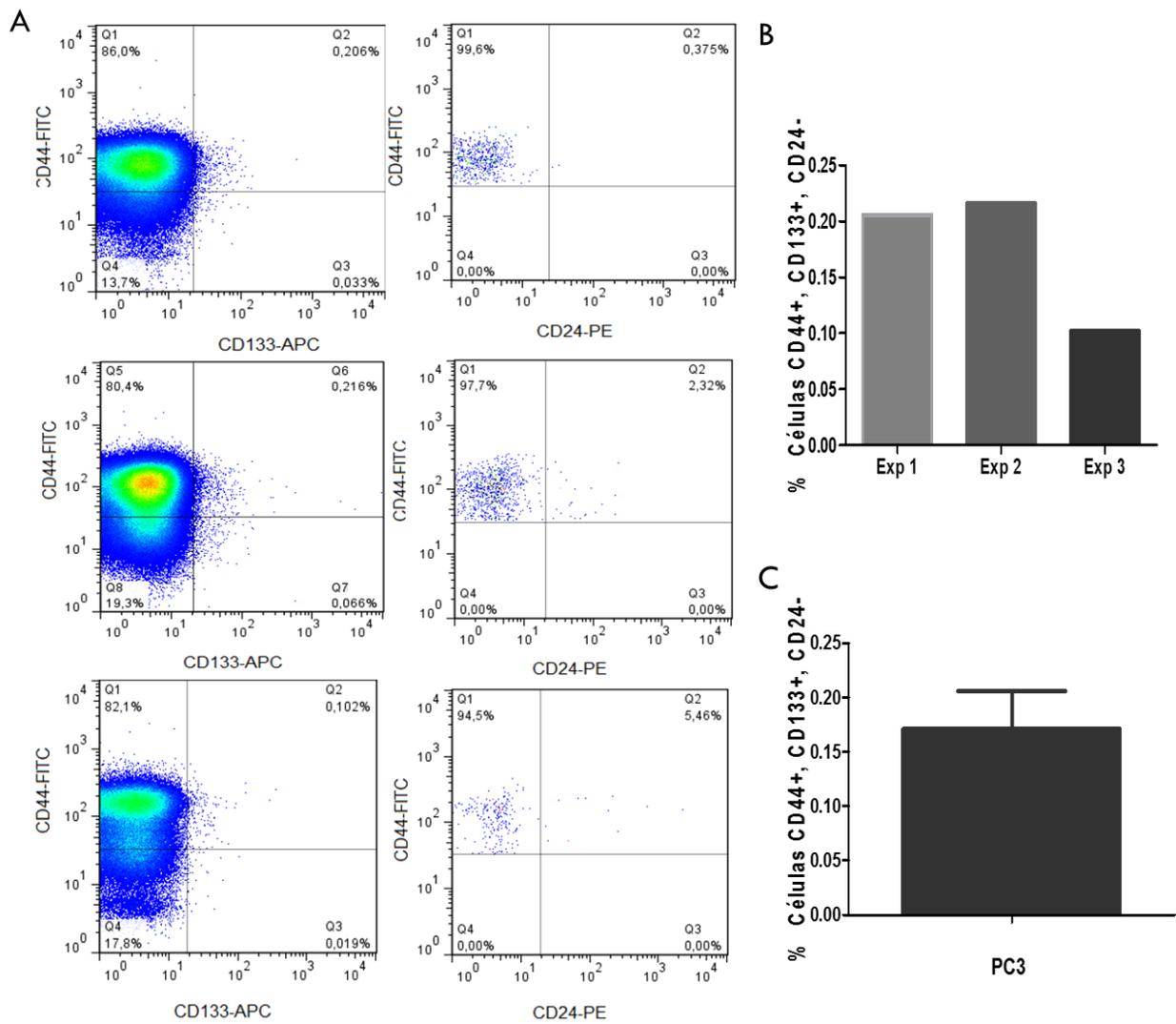


Figura 6.- Identificación de células con fenotipo troncal en la línea celular PC3. La línea celular PC3 de cáncer de próstata fue fraccionada por citometría de flujo de acuerdo a la expresión de marcadores de superficie celular: CD44, CD133, y CD24, en donde cada plot representa un experimento independiente **(A)**. Las células positivas a dichos marcadores están contenidas en el compartimiento de células CD44⁺, CD133⁺ y CD24^{low}. **(B)** representación gráfica del porcentaje de

expresión de cada experimento independiente. **(C)** porcentaje promedio de la expresión celular de CD44⁺, CD133⁺ y CD24^{low}.

En la **figura 6** se puede observar la identificación de la población troncal obtenida por medio de FACS Aria II; BD Biosciences, la cual hemos identificado como células troncales del cáncer en la línea celular PC3, esta población es positiva para los marcadores CD44+, CD133+ y es negativa o low para el marcador CD24 **(A)**. En el panel **B** se representa gráficamente el porcentaje de la población troncal de cada uno de los tres experimentos independientes, en donde en el primer experimento se identificó una población troncal con un porcentaje de 0.206%, mientras que en el experimento 2 y 3 fue de 0.216% y 0.102%, respectivamente. Por último, en el panel **C** se representa gráficamente el promedio del porcentaje de células con fenotipo troncal de los tres experimentos independientes, siendo el promedio de 0.175%.

2.- Las CTC de CaP sobreexpresan YY1, MDR1 y SOX-2

2.1.- Expresión de YY1

Por otro lado, se evaluó la expresión del factor de transcripción YY1 en CTC que han sido aisladas mediante FACS. Brevemente, se tomaron tres poblaciones: células PC3 totales (PC3), células con fenotipo troncal (PCTC) y células negativas al fenotipo troncal (NO PCTC). Como se puede observar en las microfotografías de la **figura 7A**, se muestra claramente la expresión de YY1 en el núcleo en células que son PCTC con mayor intensidad que en las otras dos poblaciones celulares, $p < 0.0017$ (prueba de comparación múltiple de Tukey). La expresión de YY1 se

observa en color café, mientras que en su correspondiente control de isotipo (CI) no hay expresión del factor de transcripción YY1, por lo tanto indica que se trata de una tinción específica y sugiere que YY1 se encuentra activo en células PCTC. El color violeta evidencia los núcleos de las células.

En la **figura 7B** se muestra gráficamente la diferencia entre la expresión total de YY1 en las tres poblaciones celulares, de manera interesante se observa una clara expresión nuclear en PCTC en comparación con las otras dos poblaciones celulares, (**figura 7C**).

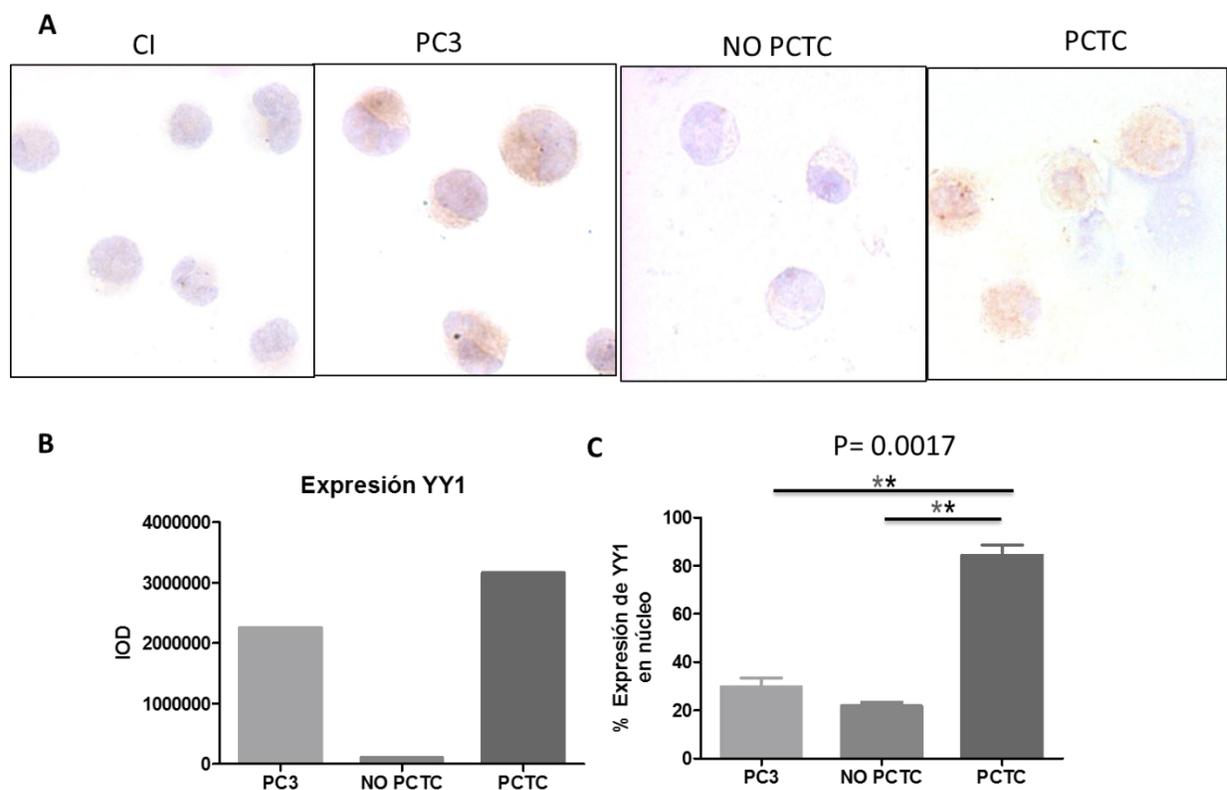


Figura 7.- Expresión de YY1 en células con fenotipo troncal de la línea celular PC3. Las micrografías muestran la expresión del factor de transcripción YY1 en células PC3 totales, células con fenotipo

troncal (PCTC) y células negativas para este fenotipo (NO PCTC) que fueron clasificadas por medio de FACS **(A)**. Se observa la expresión de YY1 nuclear mayormente en células PCTC en color café, mientras el control de isotipo (CI) demuestra que se trata de una tinción específica. **(B)** expresión gráfica total de YY1 en las tres poblaciones celulares, **(C)** representación gráfica de dos experimentos independientes de la expresión nuclear de YY1 en las tres poblaciones celulares.

Además, se puede observar una mayor expresión de YY1 significativamente en células PCTC, las cuales expresan mayor YY1 nuclear si se comparan con las células PC3 totales las cuales sólo expresan un 29 % de YY1, mientras que las células NO PCTC expresan menos del 22% a comparación de las células PCTC que expresan 84% de YY1 en el núcleo, $P < 0.0017$ (Prueba de comparación múltiple de Tukey) se usó el programa GraphPad Prisma, versión 5. Para realizar este análisis sólo se tomó en cuenta los núcleos positivos a YY1 para cada población celular.

2.2.- Expresión de MDR1

Por otra parte, se evaluó la expresión de MDR1 en las tres poblaciones celulares que se obtuvieron anteriormente (PC3, PCTC y No PCTC) en la **figura 8**, se presentan microfotografías representativas de la expresión de esta proteína en color café, se observa en las micrografías una mayor expresión de MDR1 en la población PCTC en comparación con las otras dos poblaciones analizadas **(A)**. El control de isotipo (CI), demuestra que se trata de tinción específica. En el panel **(B)** se puede observar que la población celular PCTC tiene niveles de expresión de MDR1 mayores a las otras dos poblaciones de acuerdo con la intensidad óptica integrada (IOD).

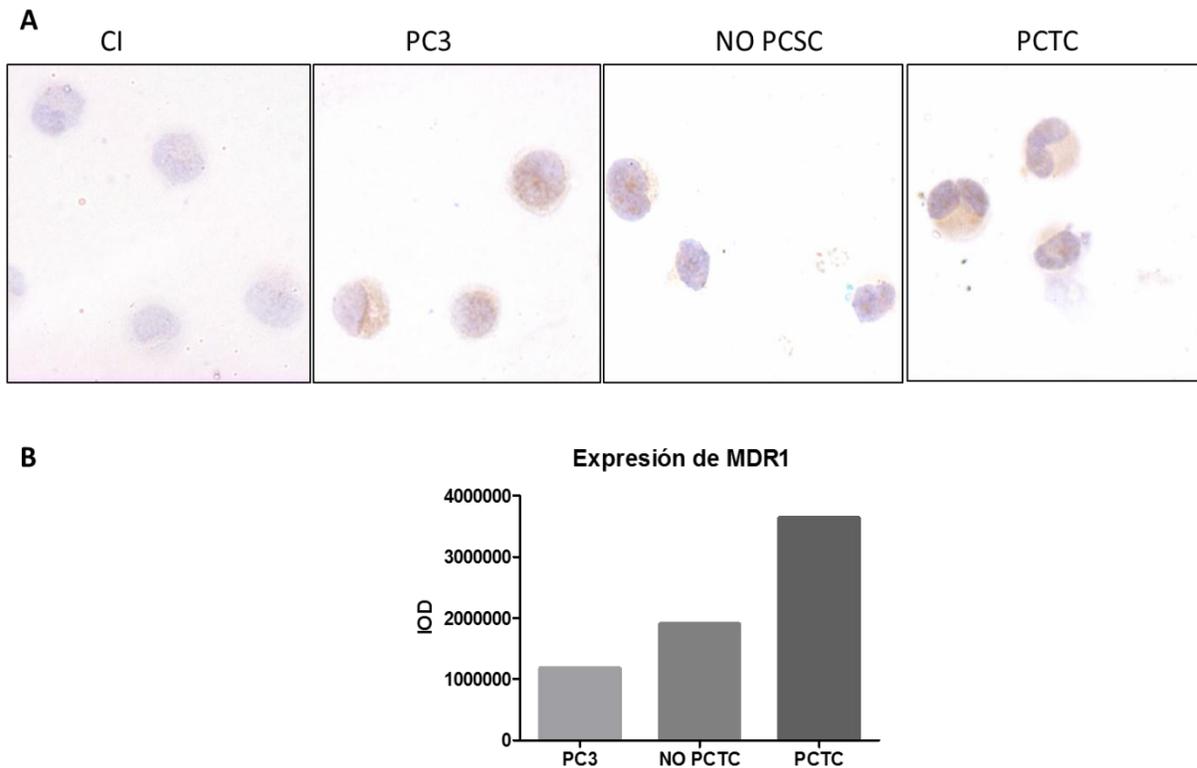


Figura 8.- Expresión de MDR1 en células con fenotipo troncal de la línea celular PC3. A) Micrografías representativas que muestran la expresión de MDR1 en células PC3 totales, PCSC y NO PCSC que fueron obtenidas por *FACS*. En estas microfotografías se observa claramente la expresión de MDR1 en color café, la cual es más intensa en células PCSC. **B)** intensidad óptica integrada para cada una de las poblaciones celulares de dos experimentos independientes.

2.3.- Expresión de SOX2

SOX2 es un factor de transcripción que es esencial para el mantenimiento de las células troncales, por ello en este trabajo evaluamos su expresión por medio de la técnica de inmunocitoquímica. Esto con la finalidad de evaluar un marcador de

troncalidad que nos confirmara que las células obtenidas por medio de FACS tuvieran un fenotipo troncal, por esta razón evaluamos la expresión de dicha proteína. Los resultados muestran en la **figura 9A** claramente que las células PCTC expresan la proteína SOX2 preferentemente en el núcleo, a diferencia de las otras dos poblaciones analizadas en donde la proteína se encuentra mayormente localizada en el citoplasma. En el panel **B**, se muestra gráficamente la intensidad óptica integrada (**IOD**) en donde la expresión de SOX2 es mayor en las células PCTC a diferencia de las otras dos poblaciones evaluadas.

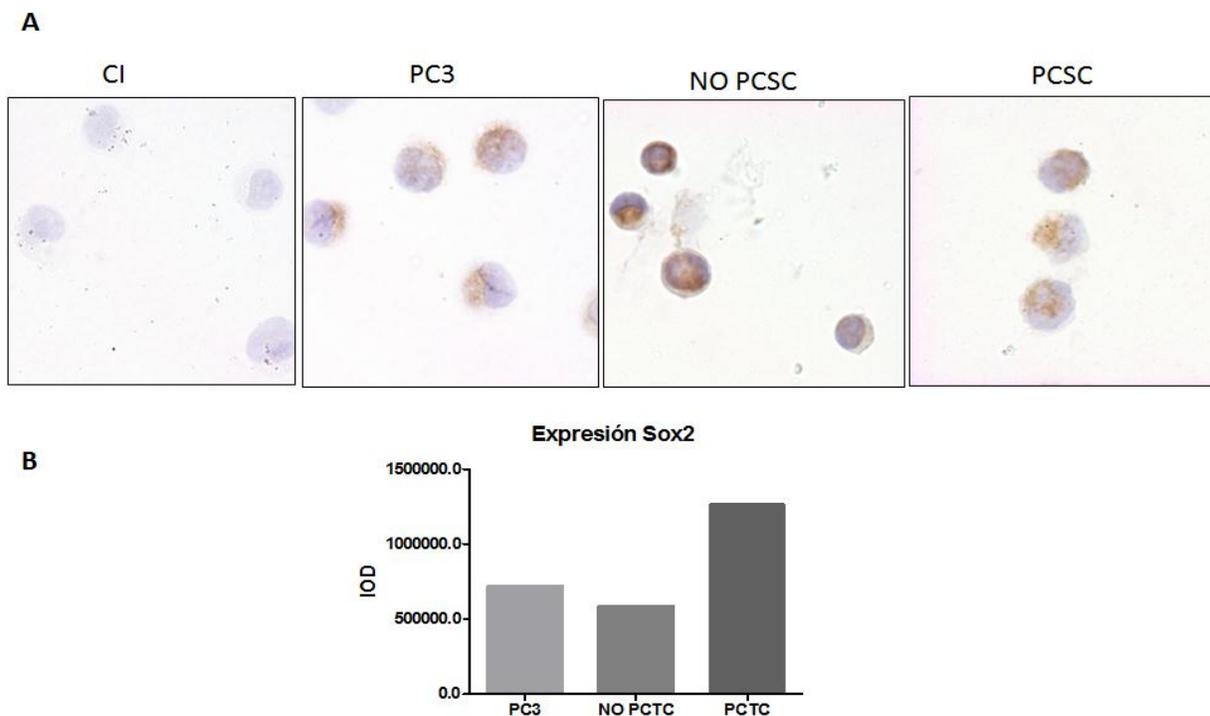


Figura 9.- Expresión de Sox2 en células con fenotipo troncal de la línea celular PC3. A) Expresión de Sox2 en células PC3, NO PCTC y PCTC se observa en las tres subpoblaciones celulares de acuerdo a su correspondiente microfotografía, además la expresión de la proteína se puede observar en el núcleo

principalmente en células PCTC. Control de isotipo (CI) muestra que la expresión de Sox2 es tinción específica. **B)** intensidad óptica integrada que demuestra cuantitativamente la expresión de Sox2 en cada una de las tres poblaciones celulares.

3.- Las CTC de CaP Co- expresan YY1 y MDR1

Por otra parte, se evaluó la co-expresión de YY1 y MDR1 en células PCTC. Para esto realizamos la técnica de doble inmunocitoquímica en nuestras tres subpoblaciones celulares. De manera interesante se puede observar en las microfotografías de la **figura 10A**, una mayor co-expresión de YY1 (café) y MDR1 (rojo) en las células que son positivas para CD44 y CD133 (95%) en comparación con las otras dos poblaciones estudiadas (PC3 y NO PCTC). Además se puede observar que en las células PCTC presentan una mayor intensidad de la expresión comparada con las células NO PCTC y PC3. En la **figura 10B** se muestra un grafica representativa de la cuantificación de la células doble positivas (YY1/MDR1).

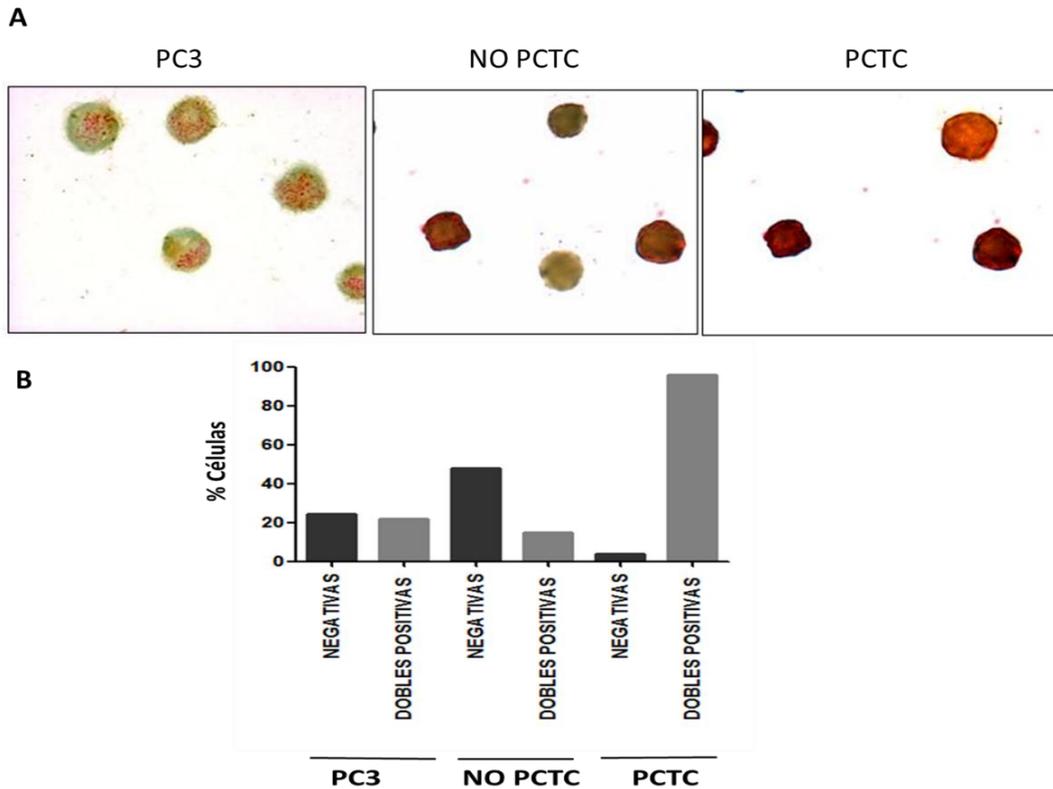


Figura 10.- Evaluación de co-expresión de YY1-MDR1 en células con fenotipo troncal. A) Las microfotografías muestran la co-expresión de YY1 y MDR1 en cada una de las subpoblaciones celulares, en color café se aprecia la expresión de YY1 (1:1500) y en rojo la expresión de MDR1 (1:2500). **B)** representación gráfica del porcentaje de células que co-expresan YY1- MDR1 en células PC3 totales, PCTC y NO PCTC.

4.- La inhibición de YY1 induce a la reversión de la quimiorresistencia en CTC de CaP

Por último, realizamos ensayos de quimiosensibilidad utilizando ensayos de MTT en células PC3, NO PCTC y PCTC, que fueron pre tratadas o no con DETANONOate (DETA) que se utiliza como un inhibidor de la actividad de YY1, a una concentración de 250 μ M durante 18 horas. Posteriormente fueron tratadas con 3 μ M de cisplatino (CDDP) y se utilizó como grupo control células no tratadas, células tratadas solo de DETANONOate y células tratadas únicamente con cisplatino. En la **Figura 11A**, se muestran los resultados de cada tratamiento en donde se puede observar que usando la combinación de DETANONOate más CDDP hay una disminución de la viabilidad celular con un 40% en comparación con las células que PC3 y NO PCTC que también fueron tratadas con las mismas condiciones, en donde las células PC3 presentan un 60%, mientras que las células NO PCTC presentan más del 80% de viabilidad celular.

A pesar de estos resultados, se puede ver claramente en células PCTC que por sí solo el tratamiento con CDDP o bien sólo la inhibición de YY1 con DETA presentan una similar viabilidad si se compara con células que se trataron con la combinación de los tratamientos en donde cada tratamiento tiene una diferencia significativa respecto al control (células no tratadas) con una $p < 0.0001$. También es importante mencionar que en las células NO PCTC se observa un nulo efecto de cada uno de

los tratamientos o su combinación en la viabilidad celular. Esta figura representa dos experimentos independientes.

Por otra parte, se evaluó el efecto de un agente quimioterapéutico sustrato de la bomba MDR1, para ello se realizó un ensayo de MTT en donde se utilizó nuevamente el inhibidor de la actividad de YY1 (DETA) sólo o en combinación con Etoposido en las tres diferentes poblaciones celulares estudiadas. Como se puede observar en la **figura 11B**, células PC3 totales que fueron tratadas con la combinación DETA + Etoposido presentan una tendencia en la disminución de la viabilidad celular, sin embargo este efecto no se presenta en las células NO PCTC pero si en las células PCTC, en donde la misma combinación claramente afecta mayormente su viabilidad en este tipo de células (menos 60%) en comparación con células PC3 en donde las células presentan más del 75% de viabilidad celular. Estos datos sugieren que la combinación tiene un mayor efecto en aquellas células que tiene un fenotipo troncal. Además, es claro que sólo DETA o bien Etoposido no presentan un importante efecto en la viabilidad pero si la combinación de estos y que es mayor dicho efecto en células PCTC que en células PC3.

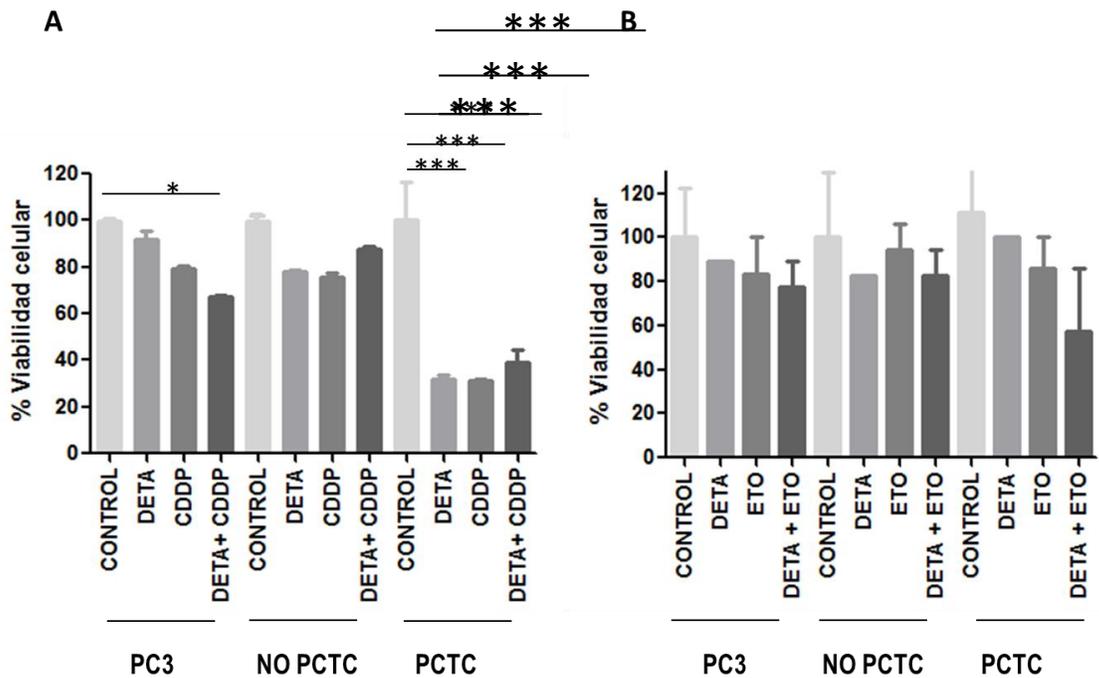


Figura 11.- La inhibición de YY1 conduce a las células con fenotipo troncal a la sensibilización a la quimioterapia. Células PC3 totales, NO PCTC, así como las células PCTC fueron tratadas o no tratadas con DETANONOato a una concentración 250 μ M por 18 horas, posteriormente se trataron con cisplatino a 3 μ M por 24 horas, representación de dos experimentos independientes, con una $p < 0.05$ (PC3) y $p < 0.0001$ (PCTC) (Prueba de comparación múltiple de Tukey) **(A)** o bien fueron tratadas con etoposido a 2 μ g/ μ l por 18 horas representación de dos experimentos independientes, (Prueba de comparación múltiple de Tukey) **(B)**.

5.- Expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con CaP

Después de analizar la expresión de YY1 y MDR1 en la línea celular de CaP, PC3 total y en población con fenotipo troncal PCTC, que demostraron que estas últimas

presentaban mayor expresión de ambas proteínas. Fue de nuestro interés analizar la expresión de YY1 y MDR1 en un número considerable de muestras de pacientes con CaP en comparación con muestras de tejido benigno y/o sangre periférica, para cual se llevó a cabo un análisis bioinformático, mediante el cual se recopilan los datos obtenidos por diversos grupos de trabajo. Los resultados se muestran en la Figura 12, donde se puede observar que los pacientes con adenocarcinoma prostático y adenocarcinoma acinar prostático presentan un aumento significativo de expresión de ambas proteínas, en comparación con tejido benigno y/o sangre periférica.

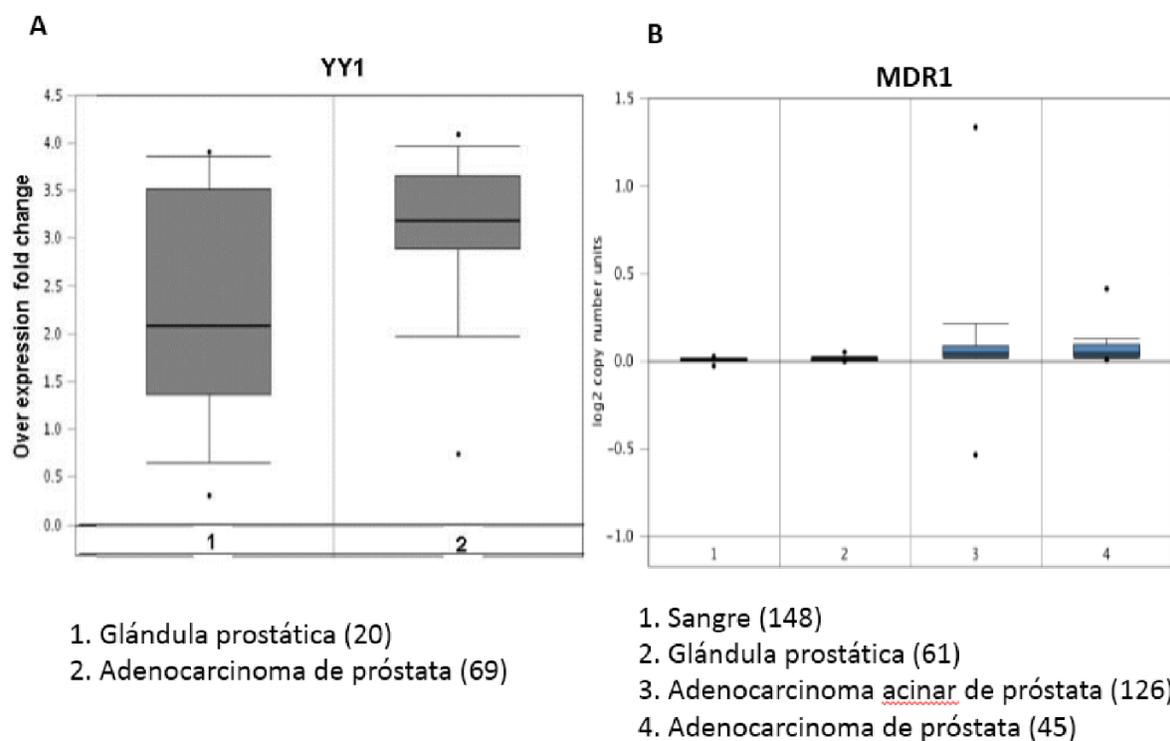


Figura 12.- Análisis bioinformático de la expresión de YY1 y MDR1 en pacientes con CaP. Las gráficas muestran el análisis de los niveles de expresión del mRNA YY1 y MDR1 en diferente número de pacientes con CaP, fue realizado usando una base de datos pública de microarreglos recuperados

de la base de datos de OncomineTM y de la expresión de genes de Omnibus. **(A)** la expresión relativa de YY1 en tejido normal y tejido tumoral. **(B)** Expresión relativa de MDR1 en sangre periférica, tejido normal y tejido tumoral. Los diagramas de caja muestran la de expresión de YY1 y MDR1 (percentil mediana, 25th y 75th) en donde se observa un aumento significativo de ambas proteínas en tejido maligno. * $p < 0.05$ tejido normal vs tejido tumoral.

DISCUSIONES

El CaP hoy en día es uno de los tumores malignos más frecuentes en los hombres en todo el mundo (43). En etapas avanzadas de esta enfermedad la quimioterapia es la única opción terapéutica, desafortunadamente el CaP exhibe una alta resistencia intrínseca a los fármacos antineoplásicos por lo que el tratamiento tiene poco impacto sobre la supervivencia del paciente (44, 45). Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la participación del factor de transcripción YY1 sobre la regulación en la expresión de MDR1. Esta última proteína que tiene un efecto como bomba expulsora de fármacos y desempeña un papel crucial en la quimiorresistencia a antineoplásicos en las células tumorales, no solo en el CaP, si no en diferentes tipos de cáncer. Reciente hallazgo de las CTC que sobre expresan esta proteína ha despertado un gran interés para su estudio, ya que esta subpoblación de células tumorogénicas con marcadores de troncalidad órgano específico son responsables de la regulación de la génesis tumoral, la proliferación, agresividad, quimiorresistencia y metástasis (9, 46-48). Es importante mencionar que un número pequeño de esta población tiene la capacidad de regenerar un nuevo tumor con la misma morfología del tumor de origen.

La expresión de diferentes marcadores de troncalidad ha permitido su aislamiento e identificación por diferentes metodologías (49, 50). En este trabajo hemos demostrado por medio de la técnica de citometría de flujo multiparamétrica, la presencia de células con fenotipo troncal (**Figura 6**) en la línea celular PC3 de CaP.

Los marcadores órgano específico para su identificación ya han sido previamente reportados (51) en donde la subpoblación con fenotipo troncal es positiva para los “clusters” de diferenciación 44 y 133, sin embargo es negativa o low para CD24 (52). Además, es importante señalar que el porcentaje de CTC reportadas en este trabajo (0.102-0.216%) es consistente con el porcentaje ya reportado que va de un 0.32-0.02 dependiendo el autor (42, 53). Además esta pequeña población identificada como CD44⁺, C133⁺ y CD24^{Low} se ha propuesto ser la responsable de la reaparición así como en la resistencia a fármacos.

Por otro lado, ya se ha reportado la expresión aumentada de YY1 en diferentes tipos de tumores, incluyendo: próstata, mama, leucemia, cáncer gastrointestinal, entre otros, y que esta expresión está relacionada con la agresividad del tumor (54-57). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que muestran la expresión de YY1 en CTC de CaP ni en otro tipo de cáncer. Por lo que nos pareció interesante demostrar si la expresión de YY1 tiene un papel importante en las células PCTC. En este trabajo por primera vez se demuestra una elevada expresión del factor de transcripción YY1 en CTC en comparación con la población celular total (PC3) y la población con fenotipo no troncal (NP PCTC) (**Figura 7**). De acuerdo con su densidad de expresión (IOD) las células troncales expresan 1.4 veces más YY1 a diferencia de las células PC3 totales. Además, de manera interesante la expresión de YY1 en CTC de CaP es preferentemente nuclear, mientras que en las poblaciones PC3 o NO PCTC mayoritariamente se expresa en citoplasma. Con respecto a la expresión de MDR1, ha sido ampliamente reportada su elevada expresión en

diferentes tipos de cáncer, así como en CTC. Nuestros resultados demuestran la expresión de MDR1 en las tres poblaciones celulares (**figura 8**), sin embargo en la **figura 8B** se puede observar una mayor expresión de esta proteína en las CTC de CaP de 3.1 veces más que las células PC3 totales o la población NO PCTC, lo cual es consistente con lo ya reportado (58-60). Asimismo en la **figura 10** demuestra claramente que las células PCTC presentan una co-expresión tanto de YY1 así como de MDR1.

Además, demostramos, por medio de inmunocitoquímica, la expresión de SOX2, un factor de transcripción que juega un papel clave en el mantenimiento de la auto-renovación de las células troncales. En este trabajo se demuestra que SOX2 también se encuentra expresado en las tres poblaciones celulares (**figura 9**). De acuerdo con algunos reportes, SOX2 se ha reportado estar expresado en diferentes tipos de tumor incluyendo en próstata (61, 62) y que dicha expresión está implicada en la metástasis en melanoma (63) y la resistencia a fármacos en cáncer de mama (64). Sin embargo, a pesar de que las tres subpoblaciones celulares evaluadas en este trabajo SOX2, de manera interesante observamos que la población con fenotipo troncal CTC expresan claramente a este factor de transcripción a nivel nuclear a diferencias de las células PC3 totales y las células negativas al fenotipo troncal en donde se observa preferentemente a nivel citoplasma. Lo anterior sugiere que en la población CTC de CaP SOX2 se encuentra activado llevando a cabo un papel clave en el mantenimiento de la auto-renovación de las células troncales.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran por primera vez la co-expresión de YY1-MDR1 en CTC (**figura 10**). Demostramos claramente una mayor co-expresión en CTC de CaP a diferencia de las células PC3 totales y las células negativas para los marcadores de troncalidad. Estos datos sugieren que su co-expresión pudiese estar jugando un papel importante en la quimiorresistencia en PCTC, conduciendo a la posible resistencia a fármacos así como en la regeneración del tumor, coincidiendo con lo reportado por nuestro grupo de trabajo en donde se demostró que YY1 regula positivamente la transcripción de MDR1 (65)

Por último, para demostrar el posible papel de la co-expresión de YY1-MDR1 en la quimiorresistencia de las células troncales de la línea celular PC3, se realizó un ensayo de viabilidad celular, en donde se empleó un donador de óxido nítrico (DETANONOato) el cual ya está reportado como un inhibidor de la actividad de YY1 (66). Como se puede observar en la **figura 11**, los resultados de MTT sugieren que la inhibición de YY1 tiene un mayor efecto en la quimiosensibilidad de las células con fenotipo troncal a diferencia de las células PC3 totales, dicho efecto es significativo con una $p < 0.0001$ en el caso de la **figura 11B**, sin embargo no existe una diferencia entre el porcentaje de viabilidad sólo con CDDP, DETA o su combinación. Por esa razón, evaluamos que sucede si utilizamos un quimioterapéutico sustrato de MDR1, en este caso se usó etoposido, como se observa en la **figura 11B** existe un mayor efecto en las PCTC tratadas con la combinación de DETANONOato + etoposido a diferencia de las células con fenotipo troncal en la **figura 11A** en donde no se observa efecto alguno. De manera interesante en la PC3 totales mostraron una

disminución en la viabilidad celular cuando fueron tratadas con la combinación DETANONOato + etoposido, sin embargo su viabilidad es mayor que en el células PCTC aunque no resulto ser significativa. Estos resultados pueden indicar que si existe un leve efecto en células PC3 que se puede explicar si consideramos que en PC3 totales existen dos poblaciones celulares las NO PCTC que representan más del 99% y las PCTC que representan el 0.213% en el mejor de los casos, entonces si consideramos lo anterior y con el entendido de que las PCTC son mayormente afectadas por la inhibidor de YY1, ya que lo expresan en mayor cantidad el resultados es el esperado. Estos resultados sugieren que la inhibición de YY1 revierte la quimiorresistencia en las células con fenotipo troncal y que esta sensibilidad es mayor si se utiliza un blanco de la proteína MDR1.

Además, fue de nuestro interés realizar un análisis bioinformático para conocer la expresión de YY1 y MDR1 en CaP, esto con el propósito de corroborar los datos obtenido previamente por nuestro grupo de trabajo en donde demuestran que YY1 regula de manera positiva la expresión de MDR1, así como corroborar los datos obtenidos en el presente trabajo, donde demostramos la sobreexpresión de ambas proteínas en célula con fenotipo troncal (PCTC). En la **Figura 12**, los resultados obtenidos el análisis bioinformático realizado, mostraron que en pacientes con CaP la expresión de YY1 y MDR1 es mayor en comparación con tejido benigno de próstata y/o sangre periférica. Lo anterior es consistente con lo reportado recientemente por nuestro grupo de trabajo que indica que YY1 regula de manera positiva la expresión de MDR1 por lo que la expresión de ambas proteínas

correlaciona de manera directa. Por otro lado, los resultados del análisis bioinformático apoyan los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde demostramos que células de fenotipo troncal de CaP (PCTC) presentan una expresión mayor de YY1 y MDR1, lo cual indica que estas dos proteínas tienen un papel importante en el desarrollo tumoral.

CONCLUSIONES

Se ha identificado y purificado una población con fenotipo troncal por medio de análisis multiparamétrico, con marcadores órgano específico CD44⁺, CD133⁺ y CD24^{low} (PCTC) a partir de una línea celular de CaP. Además, se ha demostrado la sobre expresión en dicha población de YY1 y MDR1, así como de SOX2. Por otro lado, se demostró por primera vez la co-expresión de MDR1-YY1 en células PCTC.

Nuestros resultados en conjunto sugieren que la inhibición de YY1 puede revertir la quimiorresistencia en células con fenotipo troncal. Lo cual indica la importancia de este factor de transcripción en los mecanismos de quimiorresistencia en este tipo de células. Perfilando a YY1 como un nuevo blanco terapéutico contra la quimiorresistencia intrínseca en CTC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development*. 2010;24(18):1967-2000. Epub 2010/09/17.
2. Rybak AP, Bristow RG, Kapoor A. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*. 2015;6(4):1900-19.
3. Ramírez-Balderrama L L-BS, Daza-Benítez L, Maciste H, Macías, López-Gaytán T Diferenciación neuroendocrina en adenocarcinoma de próstata. *Gaceta Médica de México*. 2013;149:639-45.
4. WHO WHO. World Cancer Report. 2014.
5. GLOBOCAN. Estimates Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2012.
6. Martínez-Sánchez YL E-dIRP, Arias-Flores R, Barrios-Bautista F Epidemiología del cáncer en pacientes adultos del Hospital de Oncología del Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. *Cirugía y Cirujanos*. 2013;81:508-16.
7. Jiménez Ríos MA SSM, Martínez Cervera P, Aguilar Ponce JL, Martínez Cedillo J, Hinojosa Gómez J, Rivera Rubí L, Zamora Moreno J. Cáncer de próstata. *Oncología*. 2011:13-8.
8. Goma A, Mir R, Martinez-Soler F, Tortosa A, Vidal A, Condom E, et al. Multidrug resistance protein 1 localization in lipid raft domains and prostasomes in prostate cancer cell lines. *OncoTargets and therapy*. 2014;7:2215-25.
9. Ni J, Cozzi P, Hao J, Duan W, Graham P, Kearsley J, et al. Cancer stem cells in prostate cancer chemoresistance. *Current cancer drug targets*. 2014;14(3):225-40. Epub 2014/04/12.
10. Kimchi-Sarfaty C, Gripar JJ, Gottesman MM. Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. *Molecular pharmacology*. 2002;62(1):1-6.
11. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *The AAPS journal*. 2005;7(1):E1-5.
12. Goda K, Bacso Z, Szabo G. Multidrug resistance through the spectacle of P-glycoprotein. *Current cancer drug targets*. 2009;9(3):281-97.
13. Cortot AB, Janne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2014;23(133):356-66.
14. Kim R. Expression of the multidrug resistance gene in human tumors. *Hiroshima journal of medical sciences*. 1990;39(3):71-7. Epub 1990/09/01.
15. Henrique R, Oliveira AI, Costa VL, Baptista T, Martins AT, Morais A, et al. Epigenetic regulation of MDR1 gene through post-translational histone modifications in prostate cancer. *BMC genomics*. 2013;14:898. Epub 2013/12/19.
16. Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, Rogers CG, Lin X, Mangold LA, et al. CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer. *The Journal of urology*. 2008;179(2):529-34; discussion 34-5. Epub 2007/12/14.
17. Chen J, Ding Z, Peng Y, Pan F, Li J, Zou L, et al. HIF-1alpha inhibition reverses multidrug resistance in colon cancer cells via downregulation of MDR1/P-glycoprotein. *PloS one*. 2014;9(6):e98882. Epub 2014/06/06.
18. Wang X, Campos CR, Peart JC, Smith LK, Boni JL, Cannon RE, et al. Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2014;34(25):8585-93. Epub 2014/06/21.

19. Yan LH, Wang XT, Yang J, Kong FB, Lian C, Wei WY, et al. Reversal of multidrug resistance in gastric cancer cells by E2F-1 downregulation in vitro and in vivo. *Journal of cellular biochemistry*. 2014;115(1):34-41. Epub 2013/09/17.

20. Vega MI, Huerta-Yepez S, Jazirehi AR, Garban H, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis. *Oncogene*. 2005;24(55):8114-27. Epub 2005/08/17.

21. Zhang Q, Stovall DB, Inoue K, Sui G. The oncogenic role of Yin Yang 1. *Critical reviews in oncogenesis*. 2011;16(3-4):163-97. Epub 2012/01/18.

22. Shi Y LJ GK. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochimica et biophysica acta*. 1997:49-66.

23. Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, Nicoletti F, Malaponte G, Traval S, et al. Yin Yang 1 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with B-cell transformation and tumor progression. *Cell Cycle*. 2010;9(3):557-63. Epub 2010/01/19.

24. Zhao G, Li Q, Wang A, Jiao J. YY1 regulates melanoma tumorigenesis through a miR-9 ~ RYBP axis. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2015;34(1):66. Epub 2015/06/25.

25. Arribas J, Castellvi J, Marcos R, Zafon C, Velazquez A. Expression of YY1 in Differentiated Thyroid Cancer. *Endocrine pathology*. 2015;26(2):111-8. Epub 2015/02/24.

26. Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, Hanna S, Garban H, Roberts A, et al. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *International journal of oncology*. 2005;27(1):131-41. Epub 2005/06/09.

27. Guangchao S. The Regulation of YY1 in Tumorigenesis and its Targeting Potential in Cancer Therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*. 2009;1:157-76.

28. Liu H, Lv L, Yang K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. *American journal of cancer research*. 2015;5(3):880-93. Epub 2015/06/06.

29. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *Journal of applied genetics*. 2008;49(2):193-9. Epub 2008/04/26.

30. Han L SS GT, Zhang Z, Sun X. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2013;3(2):65-75.

31. Chen LS, Wang AX, Dong B, Pu KF, Yuan LH, Zhu YM. A new prospect in cancer therapy: targeting cancer stem cells to eradicate cancer. *Chinese journal of cancer*. 2012;31(12):564-72. Epub 2012/04/18.

32. Wang K, Wu X, Wang J, Huang J. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:899-908. Epub 2013/03/08.

33. Moghbeli M, Moghbeli F, Forghanifard MM, Abbaszadegan MR. Cancer stem cell detection and isolation. *Med Oncol*. 2014;31(9):69. Epub 2014/07/30.

34. Tirino V, Desiderio V, Paino F, Papaccio G, De Rosa M. Methods for cancer stem cell detection and isolation. *Methods Mol Biol*. 2012;879:513-29. Epub 2012/05/23.

35. Shi LX, Ma R, Lu R, Xu Q, Zhu ZF, Wang L, et al. Reversal effect of tyroservatide (YSV) tripeptide on multi-drug resistance in resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-FU. *Cancer letters*. 2008;269(1):101-10. Epub 2008/06/10.

36. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-60. Epub 2006/10/20.

37. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England journal of medicine*. 2000;343(19):1350-4. Epub 2000/11/09.
38. Greco N, Schott T, Mu X, Rothenberg A, Voigt C, McGough RL, 3rd, et al. ALDH Activity Correlates with Metastatic Potential in Primary Sarcomas of Bone. *Journal of cancer therapy*. 2014;5(4):331-8. Epub 2014/10/21.
39. Pors K, Moreb JS. Aldehyde dehydrogenases in cancer: an opportunity for biomarker and drug development? *Drug discovery today*. 2014;19(12):1953-63. Epub 2014/09/27.
40. Dean M. Cancer stem cells: Implications for cancer causation and therapy resistance. *Discovery medicine*. 2005;5(27):278-82. Epub 2005/06/01.
41. Rowehl RA, Crawford H, Dufour A, Ju J, Botchkina GI. Genomic analysis of prostate cancer stem cells isolated from a highly metastatic cell line. *Cancer Genomics Proteomics*. 2008;5(6):301-10. Epub 2009/03/17.
42. Li K, Liu C, Zhou B, Bi L, Huang H, Lin T, et al. Role of EZH2 in the growth of prostate cancer stem cells isolated from LNCaP cells. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):11981-93. Epub 2013/06/07.
43. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(1):9-29. Epub 2014/01/09.
44. Singh S, Chitkara D, Mehrazin R, Behrman SW, Wake RW, Mahato RI. Chemoresistance in prostate cancer cells is regulated by miRNAs and Hedgehog pathway. *PloS one*. 2012;7(6):e40021. Epub 2012/07/07.
45. Semenas J, Allegrucci C, Boorjian SA, Mongan NP, Persson JL. Overcoming drug resistance and treating advanced prostate cancer. *Current drug targets*. 2012;13(10):1308-23. Epub 2012/07/04.
46. Liu X, Fu Q, Du Y, Yang Y, Cho WC. MicroRNA as regulators of cancer stem cells and chemoresistance in colorectal cancer. *Current cancer drug targets*. 2015. Epub 2015/11/19.
47. Liu C, Li Z, Bi L, Li K, Zhou B, Xu C, et al. NOTCH1 signaling promotes chemoresistance via regulating ABCC1 expression in prostate cancer stem cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;393(1-2):265-70. Epub 2014/05/02.
48. Abdullah LN, Chow EK. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and translational medicine*. 2013;2(1):3. Epub 2013/02/02.
49. Pellacani D, Oldridge EE, Collins AT, Maitland NJ. Prominin-1 (CD133) Expression in the Prostate and Prostate Cancer: A Marker for Quiescent Stem Cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;777:167-84. Epub 2012/11/20.
50. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*. 2005;65(23):10946-51. Epub 2005/12/03.
51. Cochrane CR, Szczepny A, Watkins DN, Cain JE. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers*. 2015;7(3):1554-85. Epub 2015/08/14.
52. Wang X, Ma Z, Xiao Z, Liu H, Dou Z, Feng X, et al. Chk1 knockdown confers radiosensitization in prostate cancer stem cells. *Oncology reports*. 2012;28(6):2247-54. Epub 2012/10/03.
53. REBECCA AR HC, ANTOINE D, JINGFANG J and GALINA IB. Genomic Analysis of Prostate Cancer Stem Cells Isolated from a Highly Metastatic Cell Line. *CANCER GENOMICS & PROTEOMICS*. 2008:301-10.
54. Kashyap V, Bonavida B. Role of YY1 in the pathogenesis of prostate cancer and correlation with bioinformatic data sets of gene expression. *Genes & cancer*. 2014;5(3-4):71-83. Epub 2014/07/24.

55. Wan M, Huang W, Kute TE, Miller LD, Zhang Q, Hatcher H, et al. Yin Yang 1 plays an essential role in breast cancer and negatively regulates p27. *The American journal of pathology*. 2012;180(5):2120-33. Epub 2012/03/24.
56. Bonavida B, Huerta-Yeppez S, Baritaki S, Vega M, Liu H, Chen H, et al. Overexpression of Yin Yang 1 in the pathogenesis of human hematopoietic malignancies. *Critical reviews in oncogenesis*. 2011;16(3-4):261-7. Epub 2012/01/18.
57. Chinnappan D, Xiao D, Ratnasari A, Andry C, King TC, Weber HC. Transcription factor YY1 expression in human gastrointestinal cancer cells. *International journal of oncology*. 2009;34(5):1417-23. Epub 2009/04/11.
58. Li D, Su D, Xue L, Liu Y, Pang W. Establishment of pancreatic cancer stem cells by flow cytometry and their biological characteristics. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(9):11218-23. Epub 2015/12/01.
59. Xiong B, Ma L, Hu X, Zhang C, Cheng Y. Characterization of side population cells isolated from the colon cancer cell line SW480. *International journal of oncology*. 2014;45(3):1175-83. Epub 2014/06/14.
60. Yang G, Xue F, Chen X. [Expression of MDR1 gene in cancer stem cells in breast cancer tissues of different molecular subtypes]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2012;32(11):1636-8. Epub 2012/11/24.
61. Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y, et al. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *Journal of molecular cell biology*. 2011;3(4):230-8. Epub 2011/03/19.
62. Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB, et al. Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer. *PloS one*. 2013;8(1):e53701. Epub 2013/01/18.
63. Girouard SD, Laga AC, Mihm MC, Scolyer RA, Thompson JF, Zhan Q, et al. SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2012;92(3):362-70. Epub 2011/12/21.
64. Piva M, Domenici G, Iriando O, Rabano M, Simoes BM, Comaills V, et al. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO molecular medicine*. 2014;6(1):66-79. Epub 2013/11/02.
65. Antonio-Andrés G R-SJ, Tirado-Rodríguez AB, Dorantes-Acosta E, Klunder-Klunder M, Vega MI, Lopez-Martinez B, Jiménez-Hernández E, Alvarez Rodriguez F, Torres Nava J, Pelayon R, Bonavida B, Medina-Sanson A, Huerta-Yeppez S, . Yin Yang-1 (YY1) is a potential prognostic indicator in childhood acute lymphoblastic leukemia: role of YY1 in the transcription regulation of the multi-drug resistance (MDR1) gene. . 2014.
66. Huerta-Yeppez S, Vega M, Escoto-Chavez SE, Murdock B, Sakai T, Baritaki S, et al. Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2009;20(1):39-52. Epub 2008/09/10.