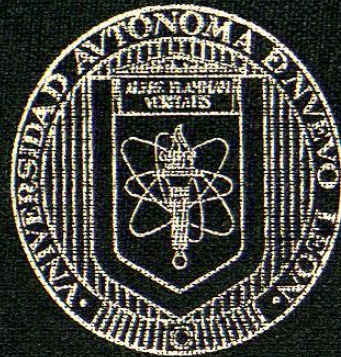


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**"CARACTERIZACION DEL GEN MDR-1 EN PACIENTES
CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA"**

Por

M. en C. SERGIO DOMINGUEZ ARREVILLAGA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA
MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

Agosto, 2005

c. 1

2005

.D66

RC643

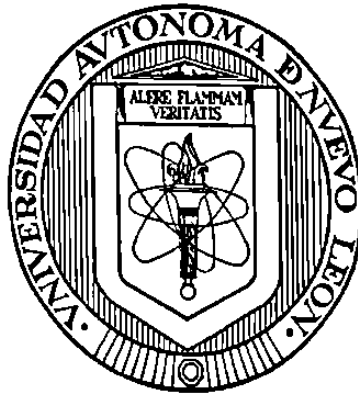
TD

"CAFFAOCITEFRIZACIOMDELGENMORF-1ENJPAOCHEMTESEN
COONLEUCCEMIA LINFOBLASTICA AGLUDDA".



1080127600

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



" CARACTERIZACIÓN DEL GEN MDR-1 EN PACIENTES
CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA "

Por

M. en C. SERGIO DOMÍNGUEZ ARREVILLAGA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

Agosto del 2005

TB

RC643

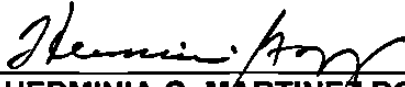
.D66

2005



**CARACTERIZACIÓN DEL GEN MDR-1 EN PACIENTES CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

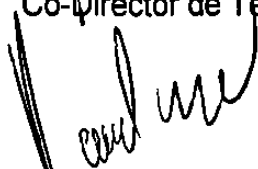
Aprobación de la Tesis:



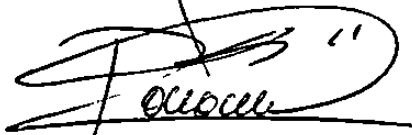
DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



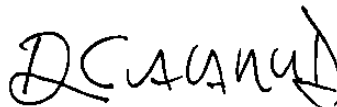
DR. DAVID GOMEZ ALMAGUER
Co-Director de Tesis



DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Comisión de Tesis



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular, de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la dirección de la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. David Gómez Almaguer y del Dr. Hugo. A. Barrera

Saldaña

AGRADECIMIENTOS

Con el respeto y la admiración de siempre, agradezco profundamente a la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez, por todas sus enseñanzas, comprensión y paciencia. Gracias por confiar en mí y por permitirme trabajar a su lado para así cumplir una meta más en mi vida.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, le doy las gracias por todas las atenciones brindadas hacia mí y por la confianza que me ha dado siempre.

Al Dr. David Gómez Almaguer, le doy las gracias por todo el apoyo brindado a través de sus conocimientos y por permitirme trabajar con sus pacientes.

A los profesores que formaron parte de la comisión de tesis, Dra. Agnes Revol de Mendoza y Dra. Rocío Ortiz López gracias por apoyarme siempre con sus consejos, disposición y por sus recomendaciones durante la revisión del manuscrito.

A mis compañeros y amigos, Luis Miguel, Lolis, Hipólito, Belarmino, Karina y Angel gracias porque de alguna u otra forma me brindaron su apoyo y su tiempo.

A todos los compañeros de la ULIEG que convivieron conmigo.

A todo el personal de la ULIEG, ya que también formaron parte del equipo de trabajo en el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Chiapas, al PAICYT de la UANL y al PROMEP de la SEP por el apoyo económico brindado.

Al Dr. Donato Saldívar Rodríguez, director de la Facultad de Medicina de la UANL por su amistad y el apoyo brindado.

Al M. en C. Guillermo García García, director de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNACH por su amistad y el apoyo brindado.

Al M. en C. Jorge Ordóñez Ruíz, Rector de la Universidad Autónoma de Chiapas por su confianza y el apoyo que siempre me ha brindado.

DEDICATORIA

A mis amores

***Mi esposa Marisol y mis hijos, Sergio y Mauricio, quienes son el motor de mi vida;
toda mi inspiración para luchar y seguir adelante.***

A mis padres

***Sres. Ricardo Domínguez Roque y Concepción Arrevillaga Calderón, por el amor que
siempre me han brindado, motivo de superación para mí.***

A mis hermanos

***Flor, Noemi, Ricardo, Patricia, Julio y Carlos, por estar siempre conmigo
y en todos mis planes.***

A mis grandes amigos

***Erika, Hipólito, Paty, Cirilo, Octavio, Luis Miguel, Mireya, Carlos,
Alvaro, Olivia, y Marichuy.***

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
I	INTRODUCCIÓN.....1
	1.1 Resistencia a Múltiples Drogas en cáncer..... 2
	1.2 Mecanismos de resistencia a la quimioterapia.....3
	1.3 Estructura del gen MDR-1.....5
	1.4 Estructura de la glicoproteína P.....6
	1.5 Expresión de la Gp-P.....8
	1.6 Mecanismo de acción de la glicoproteína P.....9
	1.7 Variaciones genéticas y polimorfismos del gen MDR-1.....12
	1.8 Participación del gen MDR-1 en Leucemias.....13
	1.9 Justificación.....15
	1.10 Hipótesis.....16
II	OBJETIVOS.....17
	2.1 Objetivo general.....17
	2.2 Objetivos específicos.....17
III	MATERIAL Y MÉTODOS.....18
	3.1 Área de trabajo, reactivos, material diverso y equipo.....18
	3.1.1 Área de trabajo..... 18
	3.1.2 Pacientes.....18
	3.1.3 Reactivos y material diverso.....19
	3.1.4 Equipo utilizado.....21
	3.1.5 Programas y equipo de cómputo.....22
	3.2 Métodos.....23
	3.2.1 Toma de la muestra.....23
	3.2.2 Estrategia experimental para el análisis de las muestras.....23
	3.2.3 Obtención de células mononucleares (CMN) de sangre periférica.....24
	3.2.3.1 Protocolo de separación de las CMN utilizando Ficoll-Hypaque.....25
	3.2.4 Ensayo de actividad de la Gp-P.....25
	3.2.4.1 Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P Utilizando rodamina 123 como sustrato.....27
	3.2.5 Aislamiento del RNA total.....28
	3.2.5.1 protocolo de extracción del RNA total de células mononucleares de sangre periférica.....28
	3.2.6 Ensayo de retrotranscripción.....30
	3.2.7 Nivel de expresión del gen MDR-1, Ensayo Taqman.....31
	3.2.8 Análisis de los polimorfismos del gen MDR-1 (SNPs) Por PCR-RFLPs.....33

3.2.9	Análisis estadístico.....	35
IV	RESULTADOS.....	36
4.1	Características de los pacientes con LLA estudiados.....	36
4.2	Actividad de la Gp-P.....	37
4.3	Frecuencia de los polimorfismos (SNPs) de la secuencia codificadora del gen MDR-1.....	38
4.3.1	Frecuencia del polimorfismo (SNP) A61G.....	38
4.3.2	Frecuencia del polimorfismo (SNP) T307C.....	40
4.3.3	Frecuencia del polimorfismo (SNP) G1199A.....	41
4.3.4	Frecuencia del polimorfismo (SNP) C1236T.....	43
4.3.5	Frecuencia del polimorfismo (SNP) G2677A.....	44
4.3.6	Frecuencia del polimorfismo (SNP) C3435T.....	41
4.4	Expresión del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.....	47
4.5	Correlación entre la expresión y actividad de la Gp-P del gen MDR-1 y la presencia de los polimorfismos.....	48
4.5.1	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo C1236T.....	49
4.5.2	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo G1199A.....	49
4.5.3	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo A61G.....	50
4.5.1	Correlación de la expresión y actividad de la Gp-P Con la presencia del polimorfismo C3435T.....	51
4.6	Relación entre el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 y la Respuesta clínica de los pacientes con LLA.....	52
V	DISCUSIÓN.....	54
VI	CONCLUSIONES.....	60
	REFERENCIAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Modelo estructural de la glicoproteína P (Gp-P).....	6
2.	Modelo de la actividad de la GP-P.....	8
3.	Estrategia experimental.....	24
4.	Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P.....	26
5.	RNA de pacientes con LLA.....	30
6.	Valores de actividad de la Gp-P.....	37
7.	Rangos de actividad de la Gp-P.....	38
8.	Digestiones con la enzima <i>Taq</i> I de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismos A61G.....	39
9.	Frecuencia del polimorfismo A61G en los pacientes con LLA.....	39
10.	Digestiones con la enzima <i>Ban</i> II de los productos amplificados de 317 pb del polimorfismos T307C.....	40
11.	Frecuencia del polimorfismo T307C en los pacientes con LLA.....	41
12.	Digestiones con la enzima <i>Eco</i> 57I de los productos amplificados de 258 pb del polimorfismos G1199A.....	42
13.	Frecuencia del polimorfismo G1199A en los pacientes con LLA.....	42
14.	Digestiones con la enzima <i>Hae</i> III de los productos amplificados de 366 pb del polimorfismos C1236T.....	43
15.	Frecuencia del polimorfismo C1236T en los pacientes con LLA.....	44
16.	Digestiones con la enzima <i>Bsr</i> I de los productos amplificados de 220 pb del polimorfismos G2677A.....	44

17.	Frecuencia del polimorfismo G2677A en los pacientes con LLA.....	45
18.	Digestiones con la enzima <i>Sau</i> 3AI de los productos amplificados de 197 pb del polimorfismos C3435T.....	46
19.	Frecuencia del polimorfismo C3435T en los pacientes con LLA.....	46
20.	Expresión del gen MDR-1 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real.....	47
21.	Expresión relativa normalizada del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.....	48
22.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C1236T y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	49
23.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo G1199A y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	50
24.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo A61G y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	51
25.	Relación entre la actividad de la Gp-P, el genotipo C3435T y la expresión del RNAm del gen MDR-1.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Mecanismos de resistencia a la quimioterapia.....	26
2.	Funciones de la glicoproteína-P (Gp-P).....	27
3.	Compuestos que interactúan con la Gp-P.....	29
4.	Condiciones de la reacción de RT.....	30
5.	Programa para la reacción de RT.....	31
6.	Condiciones de la reacción de amplificación para DNAc	33
7.	Programa de amplificación para distintos productos del DNAc del gen MDR-1.....	34
8.	Secuencia de los iniciadores, enzimas de restricción y los fragmentos esperados para cada polimorfismo estudiado del gen MDR-1.....	35
9.	Características de los pacientes con LLA.....	36
10.	Relación entre el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 y la respuesta clínica de los pacientes con LLA.....	42

NOMENCLATURA

l	Litros
ng	Nanogramo
μ M	Micromolar
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
Gp-P	Glicoproteína PHormona del crecimiento humano
cm	Centímetro
mm	Milímetro
M	Molar
h	Hora
°C	Grados centígrados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
U	Unidades
mM	Milimolar
pg	Picogramo
BSA	Albúmina sérica bovina
min	Minuto
s	Segundo
g	Gramo
ml	Mililitro
pH	Potencial de Hidrógeno
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco's
kDa	Kilodaltons

kb	Kilobases
nM	Nanomoles
pb	Pares de bases
mg	Miligramo
dNTPs	Dinucleótidos trifosfatos
μl	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetro
Abs	Absorbancia
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
PBS	Amortiguador salina fosfatos
SBF	suero bovino fetal
CMN	Células mononucleares
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNAm	RNA mensajero
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
MDR	Resistencia a múltiples drogas
RT	Retrotranscripción
RR	Riesgo relativo
P	Probabilidad

RESUMEN

M. en C. Sergio Domínguez Arrevillaga

Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.

Título del estudio:

CARACTERIZACIÓN DEL GEN MDR-1 EN
PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA

Número de páginas:

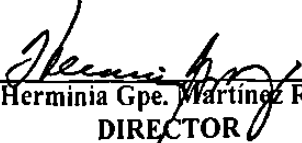
Candidato al grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería
Genética.

Área de estudio: Biología Molecular

Propósito y método del estudio. El gen MDR-1 es uno de los más estudiados en cuanto a su capacidad de conferir resistencia a drogas debido a su expresión o sobreexpresión en células tumorales. Este gen codifica para la glicoproteína P (Gp-P), una proteína transportadora dependiente de ATP, que es capaz de eliminar del interior de las células las sustancias citotóxicas, permitiendo su resistencia a la terapia antitumoral. Se han encontrado niveles altos de expresión de la Gp-P en tejidos normales de hígado, páncreas, riñón (túbulos renales), colon, yeyuno y corteza suprarrenal. Esto sugiere que podría tener un papel fisiológico en procesos de secreción. En tejidos tumorales se ha visto que la correlación entre el incremento de expresión de Gp-P y la resistencia a múltiples drogas debe ser la causa del fenotipo MDR. Se han reportado también cambios en la actividad y expresión de la Gp-P en algunos polimorfismos presentes en el gen MDR-1. Por lo anterior, se consideró importante realizar este estudio en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) para conocer la participación del gen MDR-1 en la resistencia al tratamiento con quimioterapia que se presenta en los pacientes. Se analizaron seis polimorfismos de la secuencia codificadora del gen y se relacionaron con el nivel de expresión, funcionalidad de la proteína Gp-P y la respuesta clínica del paciente. Los estudios de actividad se realizaron utilizando un bioensayo con rodamina 123 como sustrato de la Gp-P, los de expresión mediante PCR en tiempo real y la determinación de los polimorfismos se hicieron aplicando la técnica de RFLPs.

Contribuciones y conclusiones. Se evaluó la influencia de seis polimorfismos de la secuencia codificadora del gen MDR-1 sobre la expresión del RNAm y la actividad de la Gp-P en pacientes con LLA. Los SNPs que se analizaron fueron el A61G del exón 2, el T307C del exón 5, el G1199A del exón 11, el C1236T del exón 12, el G2677A del exón 21 y el C3435T del exón 26. De los seis polimorfismos estudiados, sólo se encontró diferencia significativa para el caso de la actividad de la Gp-P en los pacientes que portaban el polimorfismo C3435T, de los cuales, los que tenían el alelo C/C presentaron una mayor actividad de la Gp-P al ser comparados con los del alelo T/T; los portadores del alelo heterocigoto C/T tuvieron valores intermedios de actividad. Debido a la importancia que se le ha dado al polimorfismo C3435T y en base a los resultados significativos que encontramos con respecto a la actividad, también analizamos si existía alguna influencia de las variantes alélicas de este SNP sobre la respuesta clínica de los pacientes con LLA estudiados, y encontramos que existe 2.7 veces más riesgo de sufrir recaídas en aquellos que son homocigotos CC comparados con los pacientes CT/TT ($P = 0.029$).

Este es el primer estudio realizado en México en el que se analizó la participación del gen MDR-1 en pacientes con LLA y se correlacionaron los niveles de actividad y expresión de la Gp-P con la respuesta a la quimioterapia.


Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez
DIRECTOR

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

En los últimos años se han alcanzado grandes éxitos en la quimioterapia del cáncer; algunas neoplasias pueden ser curadas con el uso de esta modalidad terapéutica y en otras, se consigue un efecto paliativo importante de incremento de la supervivencia. A pesar de ello, muchas de las neoplasias muestran resistencia inicial a la quimioterapia, o la adquieren en el curso del tratamiento, lo que constituye el mayor obstáculo para la curación de estos casos¹.

La actividad y toxicidad de la quimioterapia del cáncer dependen de la genética individual respecto a los blancos moleculares de los fármacos y de las enzimas involucradas en el metabolismo de los mismos. La quimioterapia es ampliamente utilizada como una modalidad de tratamiento en oncología, pero su eficacia ha sido limitada, debido a que puede presentarse resistencia a múltiples fármacos, la cual se define como la resistencia celular a fármacos con funcionalidad y estructuras diferentes.

En la quimioterapia de las enfermedades malignas, la resistencia a citotóxicos constituye un gran obstáculo para la curación de los pacientes. Se han identificado varios genes, proteínas y vías metabólicas implicados en este fenómeno.

Los tumores tienden a desarrollar o adquirir resistencia durante el curso del tratamiento, a pesar de haber presentado una buena respuesta inicial al mismo^{2,3}. Se estima que la resistencia a los medicamentos utilizados contribuye

a más del 90% de las muertes por cáncer^{4,5} por lo que éste es un problema importante que requiere ser abordado con la mayor eficacia posible⁶.

1.1 Resistencia a Múltiples Drogas en el cáncer

Uno de los mayores obstáculos a la aplicación de la quimioterapia en algunos tipos de tumores, es su resistencia a los medicamentos antineoplásicos utilizados, que⁴ puede ser intrínseca o adquirirse durante el tratamiento^{7,8,9}. Uno de los mecanismos mediante el cual se llega a esta resistencia, es el de la "multirresistencia a fármacos" (MDR o "multidrug resistance") que, aunque no es el único que se conoce, es uno de los más importantes. Una de las principales características de la MDR es que, en algunos casos, las células seleccionadas en función de su resistencia a un agente citostático son también resistentes a otros agentes que no poseen ningún tipo de analogía funcional o estructural, pues unos actúan como inhibidores de la síntesis de DNA o RNA, otros intervienen en la formación de tubulina, otros en el potencial de membrana. Lo único que tienen en común estos compuestos es que son anfipáticos y que poseen anillos planos hidrofóbicos. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son los alcaloides de la vinca, las antraciclinas o podofilotoxinas¹⁰.

Los oncólogos clínicos fueron los primeros en observar que cuando el cáncer era tratado con diferentes drogas, se desarrollaba una resistencia a muchos otros agentes citotóxicos, disminuyendo así la posibilidad de cura de esos tumores con la quimioterapia. Estas observaciones sugieren que en la mayoría de los casos la MDR es el resultado de cambios hereditarios en las

células tumorales, que causan niveles alterados de proteínas específicas o de proteínas mutadas, las cuales permiten que las células malignas sobrevivan en presencia de diferentes agentes citotóxicos. Esas alteraciones genéticas que confieren resistencia a las drogas, pueden afectar la dinámica del ciclo celular, la susceptibilidad de las células a la apoptosis, la incorporación o expulsión del medicamento a la célula o pueden inducir cambios en el metabolismo celular del agente o en la reparación del daño celular¹¹. Aunque existen reportes de muchos ejemplos de esas clases de resistencia, éstos se han realizado en cultivos celulares, mientras que se conoce muy poco de los datos clínicos en cuanto a los mecanismos de resistencia *in vivo* ^{12,13}

1.2 Mecanismos de resistencia a la quimioterapia

Los mecanismos de resistencia observados en células MDR son: disminución en la acumulación intracelular del fármaco, sobreexpresión de la glicoproteína-P (Gp-P), inactivación metabólica mediada por glutatión (GSH), resistencia mediada por topoisomerasas, reparación y/o tolerancia al daño celular inducido por el fármaco^{14,15,16} (tabla1). Estos mecanismos corresponden a factores del individuo, del tumor o de las células, una vez que el medicamento ha alcanzado el citoplasma, se expone a diferentes mecanismos de detoxificación, algunos de ellos siempre están presentes, mientras que otros son inducidos por la presencia del compuesto. Incluso cuando el citostático ha alcanzado su último objetivo y ha provocado daño en el DNA, algunas células son resistentes debido a la gran capacidad de reparación de ese daño²⁰.

También se han encontrado niveles elevados de enzimas metabolizadoras de radicales libres tales como superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, asociadas a la resistencia a fármacos¹⁶. La Gp-P asociada a multirresistencia es el factor farmacológico, bioquímico y genético mejor caracterizado y representa una de las mayores barreras para el éxito de la quimioterapia del cáncer¹⁷. Se han encontrado niveles relativamente elevados de la proteína GpP en biopsias de una gran variedad de tumores¹⁸. Las células cancerosas son más eficientes que las normales para cambiar su respuesta a la quimioterapia y desarrollar resistencia. Así mismo, son más propensas a sufrir mutaciones y sus poblaciones son más heterogéneas¹⁹.

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a la quimioterapia

<p>1. Factores del hospedero: <u>Alteraciones cinéticas de los fármacos</u> a) Disminución en absorción-activación b) Aumento en excreción-degradación c) Alteración en proteínas de transporte</p> <p>2. Factores del tumor: a) Metástasis</p> <p>3. Factores celulares: <u>Alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática</u> a) Disminución en acumulación de fármacos b) Disminución de la entrada de fármacos c) Aumento de la excreción (Gp-P) <u>Alteraciones en metabolismo celular</u> a) Disminución de la activación b) Aumento de la degradación <u>Aumento niveles de moléculas detoxificantes</u> a) Glutatión b) GST c) Catalasa d) Metalotioneínas <u>Aumento de enzimas neutralizadoras de radicales libres</u> a) Catalasa b) Superoxidodismutasa Reparación de DNA Tolerancia al DNA dañado Alteración en los blancos celulares</p>
--

Modificado a partir de Pérez y cols¹⁵.

1.3 Estructura del gen MDR-1

El gen MDR-1 es uno de los más estudiados en cuanto a su capacidad de conferir resistencia a drogas debido a su expresión o sobreexpresión en células tumorales²⁰. Este gen codifica para la Gp-P, una proteína transportadora dependiente de ATP, que es capaz de eliminar del interior de las células las sustancias citotóxicas, permitiendo su resistencia a la terapia antitumoral^{21,22}. Aunque en otras especies pueden encontrarse hasta seis genes pertenecientes a la familia MDR, en humanos se han identificado dos: el MDR-1 que parece ser el responsable del fenotipo MDR, y el MDR2 que ha sido implicado en el transporte de fosfatidilcolina^{23,24}.

El gen MDR-1 codifica para un RNA mensajero (RNAm) de 4.5 kb, presente en las células con fenotipo MDR en proporción a su grado de resistencia. La sobreexpresión del gen precede frecuentemente a su amplificación^{25,26}. Los genes MDR en el hombre, están localizados en tandem en el cromosoma 7q21. El gen MDR-1 comprende un fragmento de 120 kb, y está constituido por 29 exones y 28 intrones, presenta dos sitios de iniciación de la transcripción: un sitio principal localizado a 136-140 nucleótidos río arriba del codón de iniciación ATG del DNAC que utiliza la mayoría de las líneas celulares y tejidos normales y un sitio accesorio encontrado en ciertas líneas celulares resistentes seleccionadas²⁷. Una región de 0.43 kb en posición 5' del sitio principal de iniciación de la transcripción, es suficiente para asegurar una actividad promotora *in vivo*²⁸. Esta secuencia denominada promotor proximal (P1), la cual no contiene secuencias TATA habitualmente presentes en los

promotores activos, aunque si tiene una secuencia consenso CAAT, una región rica en GC, además de múltiples sitios SP1. En el promotor del gen MDR-1 humano, el sitio AP1 situado entre las posiciones -121 y -115 es un sitio de regulación negativo²⁸.

1.4 Estructura de la glicoproteína P

La Gp-P está formada por 1,280 aminoácidos con dos dominios de unión a ATP citoplasmáticos y dos dominios hidrofóbicos, formados cada uno de ellos por seis fragmentos transmembranales que determinan la especificidad de sustrato, al formar la vía por la que éste atraviesa la membrana (Fig. 1). Esta estructura es similar a la de la superfamilia de proteínas transportadoras tipo ABC (de "ATP binding cassette")²⁹ que cuenta con más de cuarenta miembros en bacterias y en eucariotas³⁰.

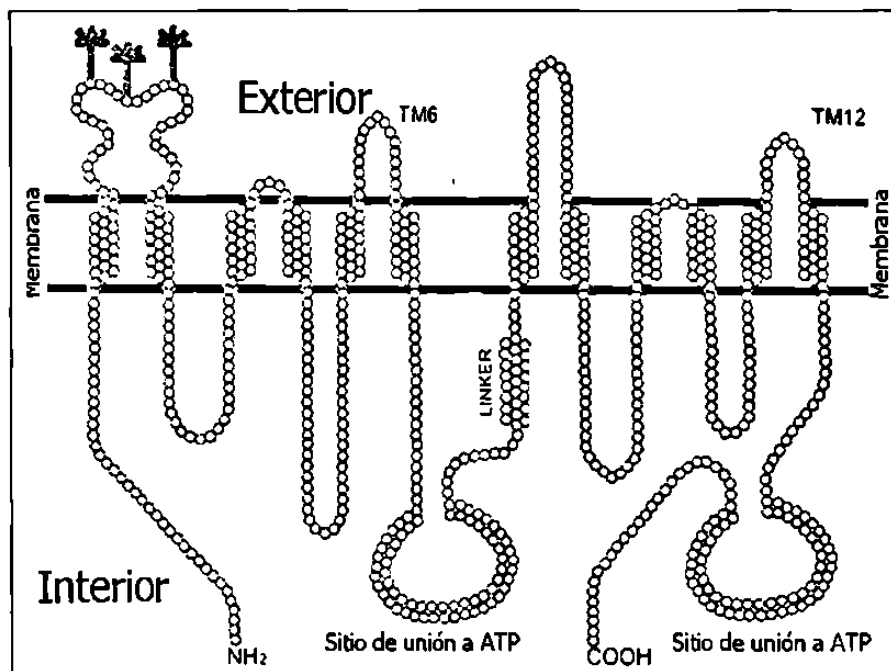


Fig. 1. Modelo estructural de la glicoproteína P, que evidencia los diferentes dominios funcionales¹²

La molécula de Gp-P consiste en dos monómeros unidos entre sí^{31,32} y cada monómero de la molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembranales unidos^{33,34}, dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal, que contiene la secuencia consenso de unión e hidrólisis del ATP³⁵. La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal³² (Fig.1). Los segmentos transmembranales están orientados de manera que el extremo C-terminal se sitúa en el lado citoplásmico de la membrana. Los tres pares de segmentos transmembranales están separados por cadenas largas de aminoácidos en la cara citoplásmica de la membrana y cadenas cortas en la superficie celular³⁶. Además, la molécula tiene residuos de carbohidratos, situados en el lado externo de la membrana, cerca del extremo N-terminal de la molécula³⁷ (Fig.1). Al menos 20 kDa de los 170-180 kDa de la proteína son debidos a los carbohidratos. Existen fuertes evidencias para asegurar que la porción exterior de carbohidratos no interviene en el transporte o reconocimiento de fármacos. El estudio de las secuencias de Gp-P muestra una estructura altamente conservada en la porción transmembranal N-terminal, la cual contiene las características de un dominio en forma de canal. Los dominios intracitoplásmicos de unión e hidrólisis del ATP forman un poro y actúan conjuntamente en el transporte activo de drogas al exterior de la célula³⁸. Esta proteína actúa como una bomba de expulsión dependiente de energía. La salida se realiza a través del poro directa o indirectamente, tras la unión a moléculas transportadoras que pueden ser un péptido o una proteína¹⁶ (Fig. 2).

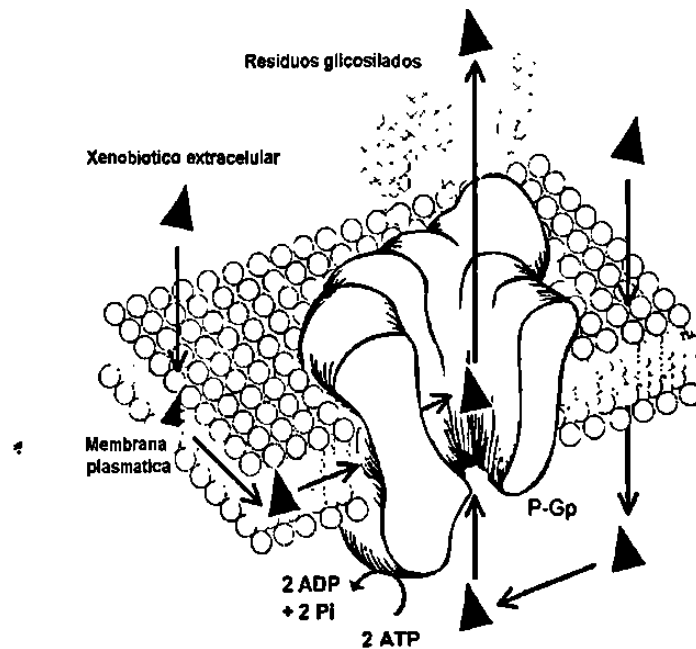


Fig. 2. Modelo de la actividad de la Gp-P. Transporte de fármacos mediados por la Gp-P, que puede ocurrir a nivel de la membrana plasmática o del compartimiento intracelular³⁹

1.5 Expresión de la Gp-P

El estudio de las alteraciones en la respuesta a diversos compuestos y la comparación de las membranas celulares de células sensibles y multirresistentes, ha puesto de manifiesto cambios en la estructura y función de la membrana plasmática²⁰. El hallazgo más importante, descubierto en células de hámster chino resistentes a colchicina³⁶, fue la sobreexpresión de la Gp-P^{40,41} codificada por el gen MDR-1, la cual es responsable de la disminución en el acúmulo intracelular de drogas antineoplásicas, observada en células multirresistentes³⁵. El grado de resistencia usualmente, pero no siempre, se encuentra correlacionado con los niveles de expresión de Gp-P cuando una línea celular se hace progresivamente más resistente *in vitro*⁴².

Se han encontrado niveles altos de expresión de la Gp-P en tejidos normales de hígado, páncreas, riñón (túbulos renales), colon, yeyuno y corteza

suprarrenal⁴³. Esto sugiere que podría tener un papel fisiológico en procesos de secreción. En tejidos tumorales se ha visto que la correlación entre el incremento de expresión de Gp-P y la resistencia a múltiples drogas debe ser la causa del fenotipo MDR⁴⁴.

Además de la Gp-P, se ha encontrado en células multirresistentes la sobre-expresión de otra proteína de membrana con actividad ATPasa de 190 kDa, denominada "multidrug resistance- associated protein" (MRP)^{45,46} que igual que la Gp-P mantiene bajos los niveles intracelulares de compuestos empleados en quimioterapia. La expresión de la proteína MRP está asociada con altos niveles de glutatión S-transferasa⁴⁷ y en algunos tipos celulares se expresa conjuntamente con la Gp-P⁴⁸.

1.6 Mecanismo de acción de la glicoproteína P

La Gp-P parece ser la responsable de una disminución en los niveles del fármaco en el interior de las células tumorales, mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP (de ahí proviene el nombre de glicoproteína P). Está directamente implicada en la permeabilidad celular y es el motivo de que algunos cánceres no respondan al tratamiento con fármacos antitumorales, lo que tiene consecuencias fatales para el paciente²¹. Esta proteína actúa como una bomba de expulsión de xenobióticos y así limita la concentración intracelular de las drogas y diversos metabolitos. Constituye un sistema de detoxificación natural que se expresa en varios tejidos humanos normales asociados con funciones secretoras o de barrera⁴⁹ (Fig. 2 y Tabla 2). Se expresa en canaliculos biliares, conductos pancreáticos, intestino delgado y

grosso, túbulos proximales del riñón, glándula adrenal, placenta y en las células endoteliales del sistema nervioso central y del testículo, pudiendo estar implicada en los supuestos santuarios de algunos procesos malignos como la leucemia linfoblástica aguda⁵⁰.

Tabla 2. Funciones de la glicoproteína-P.

1. Protección frente a xenobióticos externos (fármacos, tóxicos medioambientales, etc).
2. Transporte de hormonas esteroideas.
3. Regulación de la actividad transportadora de ión cloruro.
4. Protección frente a tóxicos endógenos.
5. Transporte de colesterol en epitelio del tubo digestivo.
6. Transporte de factores de crecimiento y citocinas en células hematopoyéticas y NK.
7. Regulación del fenómeno de apoptosis.
8. Transporte de péptidos vinculados al reconocimiento antigénico.

La mayoría de los sustratos de la Gp-P son productos naturales e incluyen alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina); antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina); epipodófiloxinas (etopósido, tenipósido) y taxanos (paclitaxel, taxoterol), inclusive agentes terapéuticos tales como inhibidores de proteasas en HIV, entre otras drogas¹², son también exportados por la Gp-P (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos que interactúan con la Gp-P.

Quimioterápicos	Otros Citotóxicos	Agentes Revertidores del MDR	Péptidos Cíclicos y Lineares
Daunorrubicina	Colchicina	Verapamil	Actinomicina D
Doxorrubicina	Emetina	Nifedipino	Gramicidina D
Mitoxantrona	Bromuro de etidio	Azidopina	Valinomicina
Etoposido	Puromicina	Quinidina	feromona de levadura
Teniposido	Mitramicina	Amiodarona	N-acetil-leucil-leucil-norleucina
Vinblastina		Reserpina	Otros compuestos
Vincristina		Ciclosporina A	Hoechst 33342
Mitomicina C		FK506	Rodamina 123
Paclitaxel		Rapamicina	Calceina - AM
Actinomicina D		Progesterona	
Topotecan		Forskolina	

Aunque no se conoce una estructura consenso de interacción con la proteína, se considera que los sustratos relacionados con ella son hidrofóbicos y anfipáticos⁵¹.

Consecuentemente la sobreexpresión de la Gp-P por amplificación del gen MDR-1 es considerada como un mal pronóstico en ciertas enfermedades tales como las leucemias, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de mama, etc⁵².

1.7 Variaciones genéticas y Polimorfismos del gen MDR-1

A pesar de la correlación existente entre la sobreexpresión del gen MDR-1 y la aparición de resistencia a drogas en experimentos de cultivo celular y en algunos tumores, se considera que aún falta mucho por conocer acerca de las variaciones individuales en la expresión del gen. En algunos casos como en ciertos tumores, la amplificación del gen MDR-1 es la responsable del incremento de los niveles y función de la proteína Gp-P, mientras que en otros padecimientos malignos, el gen MDR-1 parece ser inducido⁵³. Por tal motivo se piensa que las alteraciones o variaciones genéticas individuales en las regiones estructurales o regulatorias del gen MDR-1 pueden estar involucradas en los procesos de resistencia.

Considerando el papel que desempeña la proteína Gp-P en la resistencia, se puede asumir que de manera natural ocurren variaciones genéticas en el gen MDR-1 que pueden afectar la variabilidad interindividual en la farmacocinética y la dinámica de muchas drogas. Uno de los primeros trabajos relacionados a investigar los polimorfismos del gen MDR-1 en humanos fue realizado por Mickley en 1998, quien reportó la existencia de polimorfismos en el exón 21 y 24 (G2677T y G2995A) en líneas celulares tratadas con drogas, en linfomas malignos refractarios y en sujetos voluntarios sanos. Los polimorfismos G2677T y G2995A en el exón 21 y 24, respectivamente, producen un cambio en la secuencia de la proteína pero no afectan el nivel de expresión MDR-1⁵⁴. El primer estudio sistemático de los polimorfismos del gen, fue realizado por Hoffmeyer en el 2000, trabajo en el cual todos los 28 exones, la región central del promotor y las uniones intron-

exón fueron secuenciados a partir de DNA genómico de individuos caucásicos sanos. Se reportaron 15 polimorfismos en nucleótidos específicos (SNPs), incluyendo 6 en la región codificadora, tres de los cuales alteran la secuencia primaria de la proteína⁴⁶.

Se ha relacionado al polimorfismo encontrado en el exón 26, C3435T, con cambios en los niveles intestinales de la proteína Gp-P que influyen en la ingestión de sustratos administrados por vía oral. Individuos homocigotos para este polimorfismo (TT) presentan un bajo nivel de expresión, pero un gran aumento en la actividad de Gp-P y un incremento en los niveles plasmáticos de digoxina, sustrato administrado oralmente y cuya concentración plasmática se correlaciona con la cantidad de Gp-P intestinal y como indicador de la actividad de la proteína⁴⁶. En la mayoría de los estudios se ha asociado un aumento del nivel de expresión de la proteína, con una mayor actividad de ésta; sin embargo según Hoffmeyer este es un caso excepcional donde el efecto de la mutación es inverso. El polimorfismo C3435T, no se encuentra en el promotor y se desconoce exactamente como influye sobre la expresión de la proteína transportadora. Se considera que puede estar participando en cambios no identificados en puntos de control de la expresión, como potenciadores u otras secuencias importantes para el procesamiento del RNAm.

1.8 Participación del gen MDR-1 en Leucemias

En cuanto a la expresión del gen MDR-1 en padecimientos hematológicos malignos como las leucemias, se ha reportado que existe una sobreexpresión del gen MDR-1 en algunos pacientes y esto contribuye a la

resistencia a la quimioterapia⁵⁵. Se ha hecho el análisis de mutaciones puntuales en el promotor a partir del DNA de algunos pacientes (9 con leucemia mieloide aguda, 4 con leucemia linfocítica crónica , 1 con leucemia linfocítica aguda y 1 con linfoma no Hodgkin's), en los cuales mediante secuenciación se detectó una mutación puntual en el promotor , transición T-C en la posición -8, lo cual se consideró como parte de la patogénesis y progreso de la enfermedad⁵⁶. En un estudio clínico realizado al respecto, se considera que la expresión de la proteína Gp-P en leucemias constituye un pronóstico adverso, manifestado por la resistencia al tratamiento y recaída del paciente⁵¹. En un estudio más reciente se reportó que el polimorfismo C3435T del gen MDR-1 puede estar involucrado tanto en la susceptibilidad como en la respuesta a tratamiento en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Los que presentan el genotipo TT tienen mayor riesgo de desarrollar LLA comparado con otros individuos y de esos pacientes los que tienen el genotipo CC presentan un mal pronóstico clínico⁵⁷ .

Es importante mencionar que en nuestra región no se han realizado estudios relacionados con la expresión, actividad y polimorfismos del gen MDR-1, el cual como se ha mencionado participa importantemente en la respuesta a tratamientos en los que la mayoría de los fármacos son sustratos naturales para la Gp-P. Para este estudio es muy relevante analizar la participación de este gen en pacientes con LLA ya que es uno de los padecimientos malignos en los que las células de los pacientes presentan el fenotipo MDR y puede afectar la respuesta clínica de los mismos.

1.9 Justificación

A pesar de la correlación existente entre la expresión del gen MDR-1 y la resistencia a drogas en experimentos de cultivo celular y en tumores, aún falta mucho por conocer acerca de la relación entre los polimorfismos del gen, su expresión y la actividad de la proteína Gp-P, ya que la mayoría de los estudios se han realizado a partir de muestras de sujetos sanos y en tejidos donde normalmente se expresa la proteína como en placenta, intestino, etc.

Por lo anterior se ha considerado que uno de los genes de mayor importancia en la farmacogenética en humanos y sobre todo en cáncer es el MDR-1, ya que muchos fármacos utilizados como agentes antitumorales son sustratos para la glicoproteína-P (Gp-P); la cual es responsable del transporte de más del 30% de todas las drogas y del 90% de las utilizadas contra el cáncer, lo que afecta directamente al tratamiento en los pacientes que sufren padecimientos neoplásicos¹⁷.

En el caso de la LLA, es importante caracterizar el gen MDR-1 y conocer si tiene relación con la resistencia al tratamiento que se presenta en los pacientes, ya que se conoce poco y existen controversias en cuanto a si en este padecimiento, las variaciones en la secuencia codificadora del gen se correlacionan con el nivel de expresión y funcionalidad de la proteína Gp-P y si esto pudiera estar participando de manera directa con la resistencia. Con este tipo de estudios se podría determinar el grado de resistencia antes o durante la quimioterapia tanto de manera global como individual, lo cual podría servir para hacer una mejor elección de medicamentos y así obtener una mayor eficacia terapéutica.

1.10 Hipótesis

La presencia de polimorfismos en el gen MDR-1 afecta los niveles de actividad y expresión de la glicoproteína P en los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar los niveles de expresión, la funcionalidad de la proteína Gp-P y los polimorfismos presentes en el Gen de Resistencia a Drogas MDR-1 en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda y correlacionar esta información con la respuesta clínica del paciente debido a la quimioterapia.

2.2 Objetivos específicos

- 1.- Determinar la funcionalidad de la proteína transportadora Gp-P en los pacientes con diagnóstico de LLA.
- 2.- Cuantificar la expresión del gen MDR-1 a nivel del RNAm en los pacientes con LLA.
- 3.- Determinar los polimorfismos (SNPs) que han sido identificados en la secuencia codificante del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.
- 4.- Relacionar la presencia de los polimorfismos del gen con los resultados del nivel de expresión, funcionalidad de la Gp-P y con el comportamiento clínico del paciente con LLA.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1 Área de trabajo, reactivos , material diverso y equipo

3.1.1. Área de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Las muestras fueron tomadas en las instalaciones del Centro Regional para el Estudio, Investigación y Tratamiento de la Leucemia del Hospital Universitario (CREIT) de la U.A.N.L.

3.1.2 Pacientes

Se incluyeron en el estudio 55 individuos que acudieron al CREIT del Hospital Universitario de la U.A.N.L., que tuvieron el diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda , y que aceptaron voluntariamente participar en el proyecto mediante la firma de una carta de consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes con diagnóstico de LLA y que aceptaran participar en el estudio (carta de consentimiento informado)

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con diagnóstico distinto de LLA y que no aceptaran participar en el estudio

3.1.3 Reactivos y material diverso

- Las endonucleasas de restricción empleadas para determinar los genotipos MDR-1 por RFLPs de los pacientes LLA se adquirieron de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, y Gibco-BRL- Life Technologies, Inc (Gaithersburg, MD).
- El fenol utilizado en las extracciones de los ácidos nucleicos y los reactivos inorgánicos se adquirieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO).
- La enzima Taq DNA polimerasa, el cloruro de magnesio, el buffer de reacción y los dNTPs utilizados para la PCR fueron comprados a Promega Corp. (Madison, WI. EUA).
- El RNAsin utilizado en las reacciones de retrotranscripción fue de la marca Ambion (Woodward, TX, EUA).
- Los juegos de iniciadores fueron comprados a Biomol S.A de C.V. (México, D.F, México).
- Para la electroforesis se utilizó: Agarosa (Invitrogen), trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, EUA).

- Para la síntesis de DNAc se utilizó la enzima MMLV de Invitrogene (Carsbad, Ca, USA).
- Los tubos Eppendorf de 0.5, 1.5 y 2.0 ml y las puntillas de diversos volúmenes fueron compradas a Biomol, S.A d C.V.(México, D.F, Mx).
- La Rodamina 123 utilizada para el ensayo de actividad de la Gp-P de los pacientes con LLA se adquirió en Sigma Aldrich .
- Los tubos cónicos de 15 y 50 ml utilizados para la separación de las células mononucleares de los pacientes LLA, fueron de la marca Falcon (Cell Associates, Inc. Houston, EUA).
- El cloroformo y el etanol utilizado en las extracciones de ácidos nucleicos fueron de la marca Merck (Gibbson, NJ, EUA).
- Se utilizó suero bovino fetal inactivado para el cultivo de las células mononucleares de la marca Sigma Aldrich .
- Las jeringas utilizadas para la toma de muestra de los pacientes fueron de la marca Becton Dickinson.
- El kit de retrotranscripción utilizado para la síntesis de DNAc para la PCR en Tiempo Real fue (High Capacity DNAc Archive Kit ,Applied Biosystems, Foster City CA, USA)
- Se utilizó como marcador de peso molecular una escalera de DNA de 100 pb de la marca Gibco BRL

3.1.4 Equipo utilizado

- Microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 utilizadas para centrifugar las muestras a temperatura ambiente.
- Centrifuga Eppendorf refrigerada modelo 5403 utilizada para centrifugar las muestras a 4 °C
- Ultracongelador vertical de – 70 °C (Marca SO-LOW, Cincinnati, Ohio, USA) utilizado para almacenar y precipitar el RNA de las muestras.
- Ultracongelador vertical de – 20 °C (Marca TORREY, Mx) utilizado para almacenar los reactivos y DNAs de las muestras.
- Cámaras de electroforesis horizontal marca BioRad (Hercules, CA, EUA) utilizada en la PCR-RFLP.
- Fuente de poder Biorad (Hercules, CA, EUA) utilizada para separar las muestras de ácidos nucleicos.
- Horno de microondas GoldStar modelo MA-857M utilizado para calentar soluciones y para la preparación de la agarosa.
- Campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas City, MO, EUA) donde se realizaron las maniobras de cultivo celular en condiciones estériles.
- Incubadora con CO₂ (NAPCO SCIENTIFIC COMPANY CELL, EUA) utilizada para incubar las células mononucleares de los pacientes LLA.
- Balanza digital Sartorius modelo 1206 MP, (Camibh Gottingen, Alemania), donde se pesaron los reactivos utilizados para diversas

soluciones.

- Micropipetas marca Wilson Raining Instruments Co, Inc. (Emeryville, CA, EUA) de 10, 20, 200 y 1000 μ l.
- Ultraconcentrador (Savant, Labconco) utilizado para secar las pastillas de RNA.
- Espectrofotómetro (Beckman, Du-70) utilizado para cuantificar el RNA
- Microscopio invertido marca Karl Zeiss utilizado para la observación y conteo de las células de los pacientes.
- Fluorómetro (Versafluor, Fluorometer System; BIO-RAD) utilizado para cuantificar la rodamina 123 en el ensayo de actividad de la Gp-P.
- Vortex (Mixer 37600, Thermolyne, Iowa, USA) utilizado para mezclar las muestras en los procesos de extracción del RNA

3.1.5 Programas y equipo de cómputo

El procesamiento de datos se realizó en computadoras marca Macintosh modelo Classic II y PC IBM. Se empleó el procesador Office XP 2002.

También se utilizó un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Documentation System 1000, BIO-RAD). Los programas de biología molecular empleados fueron *Oligo* 4.0, *Amplify* 1.0 y el DNA Strider™ 1.1 (© 1989, France), así como el programa Analyst de BIO RAD (Hercules, CA, EUA).

El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word XP y Microsoft® Power Point XP de Microsoft Corporation. Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel XP y un paquete estadístico comercial (GBSTAT versión 10.0 of Dynamic Microsystems, Inc., Copyright 2004).

Los programas utilizados por vía Internet fueron: *Entrez* (Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), BLAST Network Service (Blaster); GenBank. El navegador empleado para Internet fue Microsoft Explorer Versión 6.0 (Microsoft Corporation).

3.2 Métodos

3.2.1 Toma de la muestra

A los pacientes con LLA que aceptaron participar en el estudio, se les tomó una muestra de 5-8 ml de sangre periférica por punción venosa la cual se colocó en tubos con heparina, se mezcló y se transportó en hielo al Laboratorio de Biología Celular donde se continuó inmediatamente con la estrategia experimental del estudio.

3.2.2 Estrategia experimental para el análisis de las muestras

A partir de las muestras de sangre de los pacientes, se obtuvieron las células mononucleares utilizando un gradiente de ficoll. Una parte de las células se utilizó para medir la actividad de la proteína Gp-P; la otra parte se empleó

para extraer el RNA , sintetizar el DNAc y así cuantificar la expresión y realizar el análisis de los genotipos del gen MDR-1 (Fig. 3).

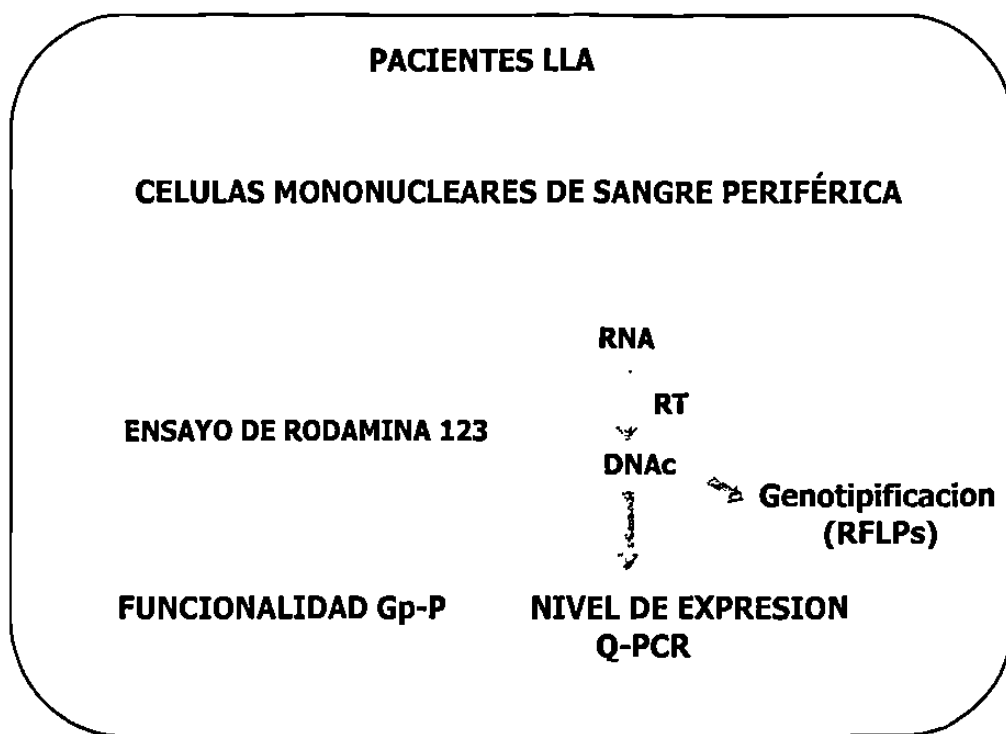


Fig. 3. Estrategia experimental. Se esquematiza el procedimiento general empleado para la determinación de la actividad, nivel de expresión y análisis de los polimorfismos del gen MDR-1 en los pacientes con LLA.

3.2.3 Obtención de células mononucleares (CMN) de sangre periférica.

A partir de 5-8 ml de sangre periférica obtenida de los pacientes, se obtuvieron las CMN utilizando para esto la técnica de separación por gradiente de densidad con Ficoll-diatrizoato de sodio. Las células obtenidas se contaron en una cámara de Neubauer y se comprobó la viabilidad utilizando el colorante supravital azul de tripano. Con las CMN obtenidas se realizaron los ensayos de funcionalidad de la proteína Gp-P, se obtuvo el RNA total para determinar el nivel de expresión y se analizaron los polimorfismos de la secuencia

codificadora del DNAC del gen MDR-1.

3.2.3.1 Protocolo de separación de las CMN utilizando Ficoll-Hypaque⁵⁸.

Una vez obtenida la sangre de los pacientes, ésta se diluyó con PBS 1X en una proporción 1:1 e inmediatamente se colocó la mezcla en un tubo falcon de 15 ml que contenía 3 ml de Ficoll-Hystopaque (Sigma, Aldrich) con un gradiente de densidad de 1.077 g/mL y después se agregaron de 5 -8 ml de sangre con mucho cuidado para no romper el gradiente de densidad. La cantidad de Ficoll-Hystopaque corresponde aproximadamente a la tercera parte del volumen de sangre a separar. Se centrifugaron los tubos durante 30 min a 4°C (1300 rpm), para luego separar con cuidado el anillo de células mononucleares de la interfase con una pipeta Pasteur, y éstas se depositaron en otro tubo falcon para lavarlas dos veces con PBS 1X, centrifugando entre cada lavado a 1500 rpm durante 15 min. Después del último lavado, se decantó el PBS y el paquete de células obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Invirogen). Se contaron las células, en una cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano (1:10) y se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 cel/ml.

3.2.4 Ensayo de actividad de la Gp-P⁵⁹

Las CMN obtenidas del paciente se utilizaron para evaluar la actividad de la proteína Gp-P utilizando para ello un sustrato fluorescente, la rodamina 123.

El ensayo consistió en dos fases, la primera llamada de inclusión en donde las células fueron incubadas con el colorante sustrato. En la segunda fase llamada de exclusión, las CMN previamente lavadas, se incubaron únicamente con el medio de cultivo. Se midió la intensidad de fluorescencia intracelular tanto en la fase de inclusión como en la de exclusión, se sacó una relación y esta fluorescencia fue proporcional a la cantidad de rodamina 123 retenida por la célula. Cabe mencionar que se utilizó Ciclosporina A como sustancia bloqueadora de la Gp-P para comprobar la funcionalidad de la proteína y del ensayo utilizado (Fig. 4). Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de 10 individuos sanos para estandarizar el protocolo.

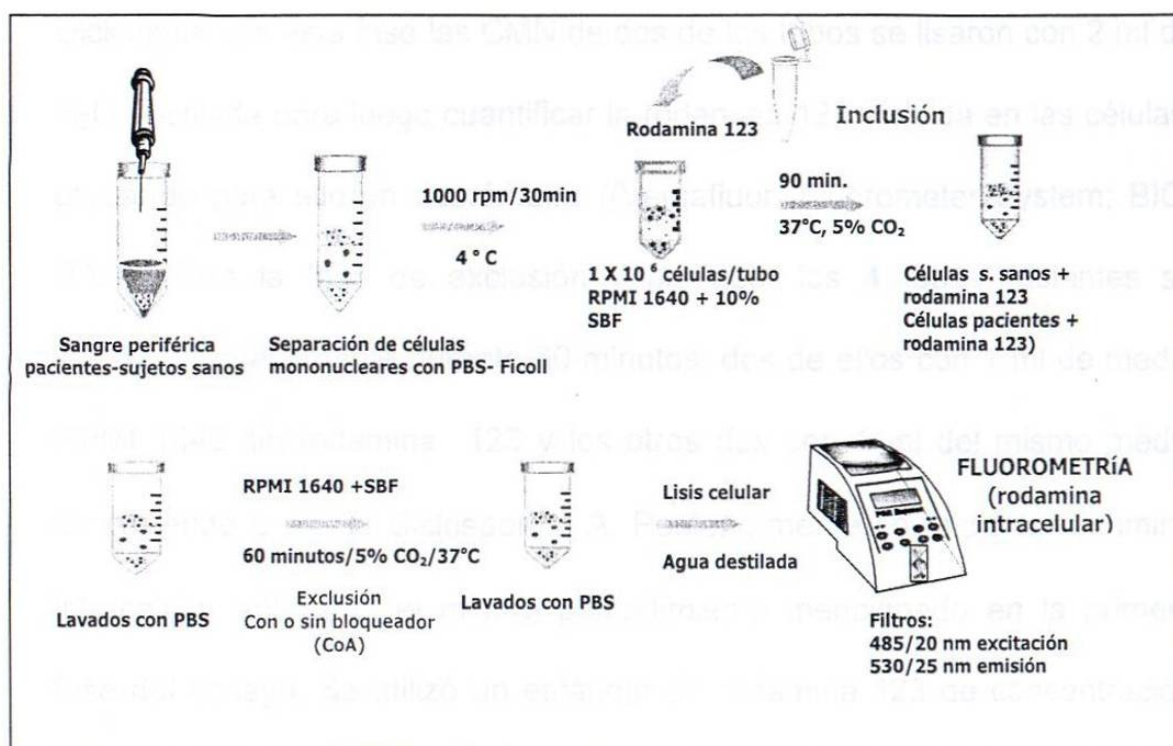


Fig. 4. Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P. Se esquematiza como se midió la actividad de la Gp-P mediante la cuantificación de la rodamina 123 intracelular en las fases de inclusión y exclusión.

3.2.4.1 Protocolo del ensayo de actividad de la Gp-P utilizando rodamina 123 como sustrato

Muestras por duplicado de 1×10^6 CMN obtenidas del paciente o de individuos sanos fueron incubadas a 37°C en una incubadora con 5% de CO_2 (Napco Scientific Company, EUA) durante 90 min en 6 tubos falcon conteniendo 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) con 200 ng de rodamina 123 (Sigma Aldrich) (fase de inclusión). Transcurrido el tiempo se centrifugaron todos los tubos, se eliminó el medio con rodamina 123 por decantación y se lavaron dos veces las células con PBS 1X, centrifugando entre cada lavado a 1000 rpm durante 5 min (Centrifuga DINAC, Becton Dickinson). En esta fase las CMN de dos de los tubos se lisaron con 2 ml de H_2O destilada para luego cuantificar la rodamina 123 incluida en las células, utilizando para ello un fluorómetro ((Versafluor, Fluorometer System; BIO-RAD). Para la fase de exclusión y bloqueo, los 4 tubos restantes se incubaron nuevamente durante 60 minutos, dos de ellos con 1 ml de medio RPMI 1640 sin rodamina 123 y los otros dos con 1 ml del mismo medio conteniendo 5 μg de Ciclosporina A. Posteriormente se midió la rodamina intracelular aplicando el mismo procedimiento mencionado en la primera fase del ensayo. Se utilizó un estándar de rodamina 123 de concentración conocida para sacar la intensidad de fluorescencia relativa. Esta fluorescencia fue proporcional a la cantidad de rodamina 123 retenida por la

célula e inversamente proporcional a la actividad de la proteína transportadora Gp-P (Fig. 4).

3.2.5 Aislamiento del RNA total

La extracción del RNA total a partir de las células mononucleares de los pacientes fue necesaria para realizar el análisis de expresión y la determinación de los polimorfismos de la secuencia codificante del gen MDR-1.

La extracción de RNA total se llevó a cabo con el método de isotiocianato de guanidina fenol-cloroformo (Chomczynski, 1987)⁶⁰.

3.2.5.1 Protocolo de extracción del RNA total de células mononucleares de sangre periférica.

Las células mononucleares de sangre periférica de cada paciente contenidas en los tubos cónicos Falcon se colocaron en hielo, se les eliminó el medio de cultivo por decantación y se lavaron tres veces con 3 ml de PBS 1X pH 7.4 (8 g de NaCl, 0.2 g de KCl y 1.44 g de Na₂HPO₄ en 1 litro de agua destilada). Posteriormente las células se lisaron con 0.5 ml de solución D (Solución patrón: 125 g de isotiocianato de guanidina en 146.5 ml de agua DEPC, 1 ml de dietilpircarbonato en 999 ml de agua milliQ, calentando para favorecer la disolución, 8.8 ml de citrato de sodio 0.75 M pH 7 y 13.2 ml de sarcosil al 10%. Solución de trabajo: a 50 ml de la solución patrón se le adicionaron 0.36 ml de β-mercaptoetanol, el lisado se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 ml y se adicionaron 50 µl de solución de acetato de sodio 2 M

pH 4.0, se agitó por inversión. Se agregaron 0.5 ml de fenol saturado con agua tratada con dietilpirocarbonato y se agitó por inversión. Se agregaron 0.1 ml de solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), luego se agitó en vortex (Mixer 37600, Thermolyne) por 10 seg. para después incubar en hielo por 15 min. La muestra se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5403), se recuperó la fase superior y el RNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y los tubos se incubaron por 1 h a -70°C para precipitar el RNA. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron por 10 min a 14,000 rpm y a 4°C para sedimentar el RNA, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de solución D, la pastilla formada se resuspendió con una puntilla, se adicionaron 0.5 ml de etanol absoluto frío y se dejó precipitar de nuevo a -70°C (Ultracongelador vertical, SO-LOW), por una 1h. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min y la pastilla formada se lavó con etanol al 70% en agua DEPC y se centrifugó de nuevo. La pastilla de RNA se secó en el evaporador -concentrador (Labconco)) por 15 min y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC. La cantidad y calidad del RNA se determinó por espectrofotometría (Beckman, Du-70), para esto se tomaron 4 µl de muestra y se diluyeron con 996 µl de agua milliQ, la lectura se realizó a una longitud de onda de 260 nm. El valor obtenido en la lectura se multiplicó por 10, el resultado es equivalente a concentración de RNA en mg/ml. Para verificar la presencia y calidad del RNA obtenido se hizo una electroforesis de éste en un gel de agarosa al 1% (Fig. 5).

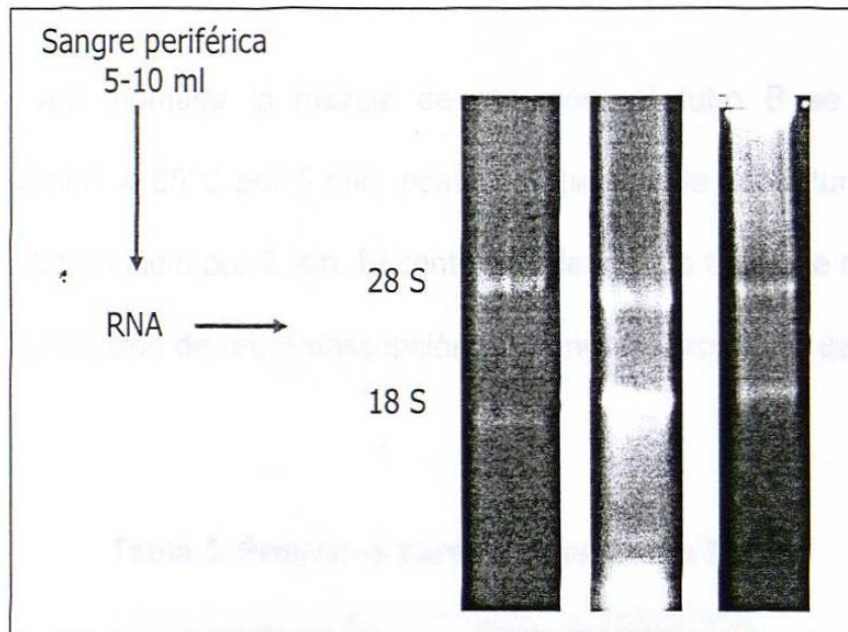


Fig. 5. RNA de pacientes con LLA. Se muestra en la figura el corrimiento electroforético de RNA en un gel de agarosa al 1%

3.2.6 Ensayo de retrotranscripción (RT)

Una vez realizada la extracción de RNA total y determinada su concentración se montó una reacción para sintetizar el DNAc, las condiciones de reacción se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de la reacción de RT

	Reactivo	Volumen (µl)
Tubo A	Buffer (5X)	2.0
	dNTPs (10 mM)	1.0
	DTT (100 mM)	1.0
	RNAsin (20 U/µl)	0.5
	BSA (10 mg/ml)	0.2
	MMLV-RT (2 U/µl)	0.2

	Agua milliQ estéril	3.1
Tubo B	RNA (1 µg/µl)	1.0
	Random primers (3 µg/µl)	1.0

Una vez montada la mezcla de reacción, el tubo B se sometió a desnaturalización a 65°C por 5 min, pasado el tiempo de desnaturalización el tubo se incubó en hielo por 2 min. El contenido de ambos tubos se mezcló y se sometió a la reacción de retrotranscripción utilizando el programa descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Programa para la reacción de RT

Temperatura °C	Tiempo (min)
25	10
42	60
70	15

3.2.7 Nivel de expresión del gen MDR-1, Ensayo Taqman ^{61,62,63}

Para realizar la cuantificación de la expresión del gen MDR-1, se realizó la amplificación por PCR de una región determinada del DNAc, utilizando un juego de iniciadores específicos y una sonda también específica, marcada en el extremo 5' con una molécula fluorescente llamada "reportero", y en el extremo 3', con otra molécula fluorescente llamada "apagador" de la molécula reportero (ensayo Taqman). En este ensayo cuando la Taq polimerasa alcanza el sitio de hibridación de la sonda durante la extensión de los iniciadores, digiere la sonda (actividad 5' exonucleasa) liberándose el reportero del apagador y la

fluorescencia que emite puede ser detectada y medida durante la fase de extensión de la PCR (Real Time). Mediante esta técnica se puede detectar el nivel de expresión del RNAm o DNAc expresados por el gen MDR-1 en las células de cada paciente LLA.

El RNA fue tratado con DNasa (RNase free DNase Kit, Ambion) y a partir de éste fue sintetizado el DNAc con un Kit de retrotranscripción (High Capacity DNAc Archive Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El RNAm fue cuantificado utilizando un ensayo de expresión génica (Assay on Demand Gene Expression kit Applied Biosystems, Foster City CA, USA) que incluía los iniciadores sin marcar, el reportero marcado Taqman (FAM) y la sonda MGM. La cuantificación se realizó utilizando el equipo de detección ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, the USA). La secuencia del DNAc utilizada se obtuvo de la base de datos del banco de genes con número de acceso M14758. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ l conteniendo el DNAc, y cantidades optimizadas de los iniciadores de acuerdo a las condiciones especificadas por el fabricante del ensayo (1 \times Universal TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City CA, the USA). Los resultados de la expresión del RNAm del gen MDR-1 fueron normalizados utilizando como estándar el gen constitutivo de GAPDH (TaqMan Human Endogenous Control Reagents, Applied Biosystems).

3.2.8 Análisis de los polimorfismos del gen MDR-1(SNPs) por PCR-RFLPs⁶⁴

Para determinar los polimorfismos del gen MDR-1, como se mencionó anteriormente se sintetizó primero el DNAc mediante retrotranscripción a partir del RNA total obtenido de las células mononucleares de los pacientes. El tamaño del DNAc es de 4501 nucleótidos y para la búsqueda de los SNPs reportados en la secuencia codificadora se realizó primero una PCR utilizando juegos de iniciadores específicos para cada polimorfismo (tabla 6), los cuales fueron utilizados para amplificar por PCR los fragmentos correspondientes y posteriormente fueron analizados para detectar las variantes polimórficas mediante RFLPs (tabla 8).

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron utilizando las condiciones especificadas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de amplificación para los DNAc.

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de reacción 10X	2.5
Cloruro de Magnesio 25 mM	1.5
dNTPs 10 mM	0.5
Oligo 5 µM	2.0
Oligo 5 µM	2.0
Taq DNA polimerasa 5 U/µl (Epicentre)	0.25
DNAc	3.0
Agua milliQ Estéril	13.25

Una vez montada la mezcla de reacción, se sometió a amplificación utilizando un termociclador Perkin-Elmer 9700 y el programa mostrado en la tabla 7

Tabla 7. Programa de amplificación para distintos productos del DNAC del gen MDR-1

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1 Desnaturalización	94	2 min
2 Desnaturalización	94	30 s
3 Alineamiento	60	30 s
4 Extensión	72	30 s
35 ciclos regresando al paso 2		
5 Extensión	72	7 min

Para visualizar los productos amplificados de diferentes tamaños, se tomó una alícuota de la reacción y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, posteriormente se realizó una tinción con solución de bromuro de etidio y se analizó en el fotodocumentador Gel-Doc.

Los fragmentos amplificados fueron cortados durante 16 h a 37°C con enzimas de restricción específicas para cada polimorfismo estudiado (Tabla 8). Los fragmentos generados después de la digestión fueron separados en geles de agarosa al 3 % haciendo la tinción y el análisis de los resultados de la misma manera como se mencionó anteriormente.

Tabla 8. Secuencia de los iniciadores, enzimas de restricción y los fragmentos esperados para cada polimorfismo estudiado del gen MDR-1.

SNP	Secuencia del primer	Enzima de restricción	Fragmento, pb
Ex 02 A61G	5'-AGG AGC AAA GAA GAA GAA CTT TTT-3' 5'-GAT TCC AAA GGC TAG CTT GC-3'	<i>Taq I</i>	*317 **285, **32
Ex05 T307C	5'-AAT GGA GAC TAA AGA GTC ATA AAT G-3' 5'-ACC TGG TCA TGT CTT CCT CC-3'	<i>Ban II</i>	*104 **72, **32
Ex11 G1199A	5'-CAG CTA TTC GAA GAG TGG GC-3' 5'-CCG TGA GAA AAA AAC TTC AAG G	<i>Eco 57I</i>	*52, *206 **258
Ex12 C1236T	5'-TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C 5'-CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG-3'	<i>Hae III</i>	*269, *62, *35 **269, **97
Ex21 G2677A	5'-TGC AGG CTA TAGGTT CCA GG-3' 5'-GTT TGA CTC ACC TTC CCA G-3'	<i>Bsr I</i>	*220 **206, **14
Ex26 C3435T	5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG 5'-AAG-3' GCA TGT ATG TTG GCC TC-3'	<i>Sau 3AI</i>	*158, *39 **197

* Fragmentos del alelo silvestre; **Fragmentos del alelo variante, Pb, pares de bases

3.2.9 Análisis estadístico

La diferencia entre las medias de los grupos y las variables continuas fueron evaluadas para la significancia estadística por ANOVA y con la prueba de Student-Neuwman-Keuls de dos colas.

Las variables discretas se analizaron mediante Chi-cuadrada y con Riesgo Relativo (RR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. La significancia estadística fue establecida para valores de $p < 0.05$. Los datos se reportaron en porcentajes, medias, desviaciones estándar, IC y RR. Todo el análisis se realizó usando un paquete estadístico comercial (GBSTAT versión 10.0 of Dynamic Microsystems, Inc., Copyright 2004).

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Características de los pacientes con LLA estudiados

En el presente estudio se incluyeron un total de 55 pacientes (26 mujeres y 29 hombres) con un promedio de edad de 18 años (rango, 4 – 57 años). De estos pacientes, 15 (25.4 %) sufrieron recaídas durante el tratamiento y 12 (21.8 %) fallecieron (Tabla 9).

Tabla 9. Características de los pacientes con LLA

Pacientes (n = 55)	n (%)
Sexo	
Masculino	29 (52.7)
Femenino	26 (47.3)
Edad (Años)	
Media	18
Rango	4-57
Respuesta Clínica	
Recaídas	15 (25.4)
	40 (72.7)
No recaídas	43 (78.2)
	12 (21.8)
Sobrevivientes	
Fallecidos	

4.2 Actividad de la proteína Gp-P

De acuerdo a la metodología descrita se incluyeron en el estudio de actividad 10 muestras de sujetos sin LLA, con el objetivo de estandarizar el bioensayo con rodamina 123 utilizada como sustrato; y se encontró un rango de actividad de la Gp-P de 48.4% - 68.3%, de estos individuos seis presentaron actividad baja de la Gp-P (48%-57%), cuatro actividad intermedia (58%-69%) y ninguno presentó actividad alta de la Gp-P (Fig. 6).

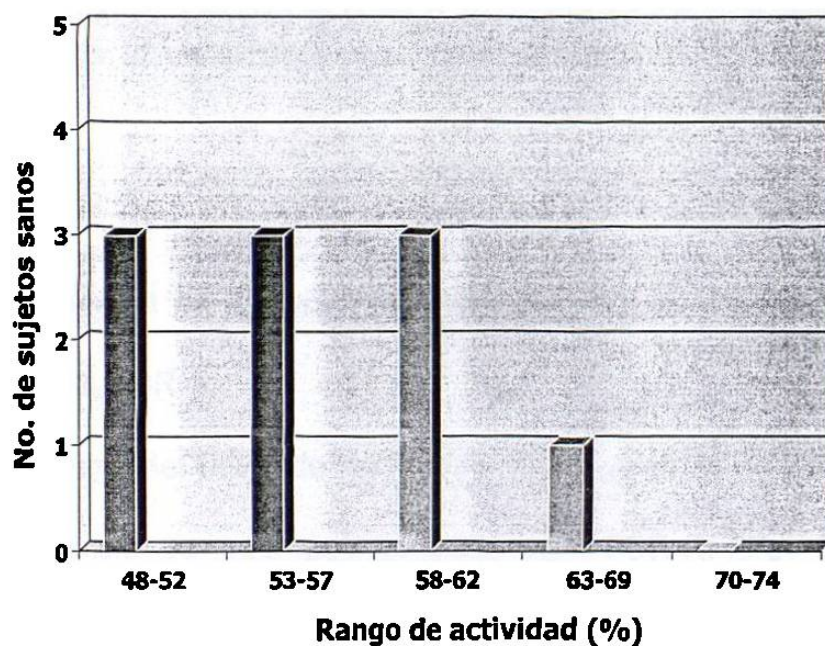


Fig. 6. Valores de actividad de la Gp-P. Se muestran los resultados de 10 muestras de sujetos sin LLA analizados mediante el bioensayo con rodamina 123

En los pacientes con LLA, el rango de actividad fue de 55% - 94%, mayor al encontrado en los sujetos sin LLA; de estos pacientes tres presentaron actividad baja de la Gp-P (55%-59%), siete actividad intermedia (60%-74%) y 45 actividad alta (75%-94%) (Fig. 7).

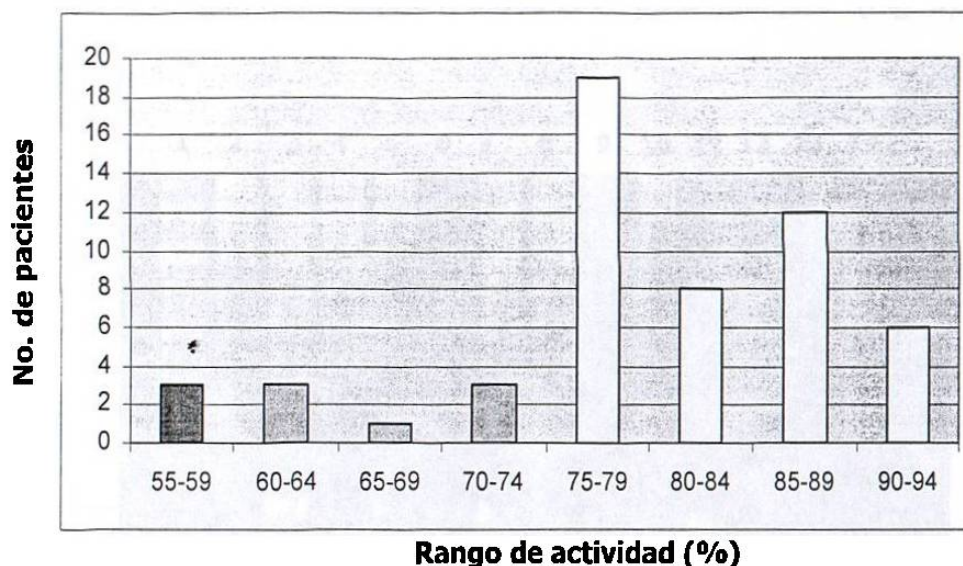


Fig. 7. Valores de actividad de la Gp-P. Se muestran los resultados de 55 muestras de pacientes con LLA analizados mediante el bioensayo con rodamina 123.

4.3 Frecuencia de los polimorfismos (SNPs) de la secuencia codificadora del gen MDR-1

A partir del DNAc de las células mononucleares de los pacientes, se hizo el análisis de seis polimorfismos por PCR-RFLPs. Los polimorfismos estudiados fueron el A61G del exon2, el T307C del exon 5, el G1199A del exon 11, el C1236T del exon 12, el G2677A del exon 21 y el C3435T del exon 26. Esto se hizo a partir de RNA debido a que se necesitaba determinar el nivel de expresión del gen MDR-1 y la cantidad de muestra de sangre obtenida de los pacientes era en ocasiones muy pequeña.

4.3.1 Frecuencia del polimorfismo (SNP) A61G.

Al hacer las digestiones del producto amplificado de 317 pb con la enzima de restricción *Taq I* (Fig. 8), se encontró que el 92.7 % de los