

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES P1 Y P2 DEL GEN *C-MYC* POR
EFECTO DE LOS FÁRMACOS ISOTRETINOINA Y TALIDOMIDA
EN DOS LÍNEAS CELULARES HEPÁTICAS**

POR

PAULINA JANETH BARRAZA REYNA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

MAYO, 2019

**ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES P1 Y P2 DEL GEN *c-MYC* POR
EFECTO DE LOS FÁRMACOS ISOTRETINOINA Y TALIDOMIDA
EN DOS LÍNEAS CELULARES HEPÁTICAS**

Comité de tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez
Presidente

Dra. Vianey González Villasana
Secretario

Dr. Fermin Mar Aguilar
Vocal

Dra. Claudia D. Altamirano Torres
Vocal

Dra. Katia Peñuelas Urquides
Vocal

**ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES P1 Y P2 DEL GEN *c-MYC* POR
EFECTO DE LOS FÁRMACOS ISOTRETINOINA Y TALIDOMIDA
EN DOS LÍNEAS CELULARES HEPÁTICAS**

Por

L.B.G. Paulina Janeth Barraza Reyna

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección del Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León, y en la Unidad de Biología del Desarrollo del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez.

El trabajo fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social a través del Fondo de Investigación en Salud con números de registro R-2014-1906-22 y FIS/IMSS/PROT/G17-2/1746.

Dra. Diana Reséndez Pérez
Directora interna

Dr. Mario A. Bermúdez De León
Director externo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme continuar con mi formación académica., al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado en el transcurso de mis estudios de maestría (No. de becario 823509), al Instituto Mexicano del Seguro Social por el financiamiento del proyecto y permitirme realizar el trabajo experimental en sus instalaciones, al Dr. Michael Cole por la donación de los vectores, a los miembros de mi comité de tesis por sus sugerencias a lo largo del desarrollo del proyecto, y en especial a mis directores de tesis, Dra. Diana Reséndez Pérez y Dr. Mario A. Bermúdez de León por la oportunidad, confianza y apoyo.

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y amigos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Cáncer hepático	3
2.2. Factores genéticos que contribuyen al desarrollo de cáncer hepático	4
2.3 Características y función de <i>c-MYC</i>	5
2.3.1. Promotores de <i>c-MYC</i>	7
2.3.2. Promotores P1 y P2	9
2.4. Alteraciones en <i>c-MYC</i> en cáncer hepático	10
2.5. <i>c-MYC</i> como blanco terapéutico	11
2.6. Inhibidores de histona deacetilasa (iHDAC)	13
2.7. Inhibidores de las DNA metiltransferasas (iDNMT)	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos particulares	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1. Construcciones plasmídicas	19
6.2. Transformación de bacterias competentes	20
6.3. Extracción de DNA plasmídico	20
6.4. Caracterización enzimática	21
6.5. Purificación de DNA plasmídico	21
6.6. Secuenciación	22
6.7. Modelo celular	23

6.8. Transfección	23
6.9. Tratamiento farmacológico	24
6.10. Ensayo de actividad luciferasa	24
6.11. Análisis estadístico	25
7. RESULTADOS	26
7.1. Caracterización de los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2	26
7.2. Actividad de los promotores P1 y P2 de <i>c-MYC</i> en células HepG2 y HuH-7	28
8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIONES	39
10. PERSPECTIVAS	40
11. BIBLIOGRAFÍA	41
RESUMEN BIOGRÁFICO	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de las proteínas de la familia <i>c-MYC</i>	6
Figura 2. Mecanismo de activación y represión de <i>c-MYC</i>	7
Figura 3. Gen <i>c-MYC</i> humano	8
Figura 4. Promotores P1 y P2 del gen <i>c-MYC</i>	8
Figura 5. Actividad del promotor P1 del gen <i>c-MYC</i> humano en células Hepa-1	9
Figura 6. Evaluación de la expresión del gen <i>c-MYC</i> por efecto de fármacos epigenéticos en células HepG2	14
Figura 7. Construcciones pGL3-promotor <i>c-MYC</i>	19
Figura 8. Digestión enzimática de los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2	26
Figura 9. Visualización de vectores pGL3 con los promotores de <i>c-MYC</i> purificados	27
Figura 10. Caracterización de los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 por secuenciación	28
Figura 11. Actividad de los promotores P1 y P2 de <i>c-MYC</i> humano en células HepG2.	29
Figura 12. Actividad de los promotores P1 y P2 de <i>c-MYC</i> humano en células Huh-7.	29
Figura 13. Actividad de los promotores P1 y P2 de <i>c-MYC</i> humano en células HepG2 en respuesta a fármacos.....	30
Figura 14. Actividad de los promotores P1 y P2 de <i>c-MYC</i> humano en células Huh-7 en respuesta a fármacos.....	31
Figura 15. Actividad del promotor P2 de <i>c-MYC</i> humano en células HepG2 en respuesta a fármacos durante 24, 48 y 72 h	31
Figura 16. Actividad del promotor P2 de <i>c-MYC</i> humano en células HepG2 en respuesta al fármaco isotretinoína a distintas concentraciones	32

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

BAF	<i>BRG1-associated factor</i>
CMV	Citomegalovirus
CRD-BP	<i>Coding region instability determinant-binding</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
g	gravedades
h	Hora u horas
HDAC	Histona deacetilasa
HLH	<i>Helix-loop-helix motif</i>
iHDAC	Inhibidores de histona deacetilasa
LB	Luria Bertani
MDM2	<i>Mouse double minute 2 protein</i>
min	Minuto
mL	Mililitro
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
s	Segundo o segundos
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
STE	Buffer de Cloruro de Sodio-Tris-EDTA
TE	Buffer de Tris y EDTA
T _m	Temperatura de fusión
TRET	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, representa un estimado de 9.6 millones de muertes en todo el mundo, de las cuales 782,000 son por cáncer hepático. Los principales factores ambientales y biológicos que inducen el desarrollo de cáncer hepático son el consumo excesivo de alcohol y la infección crónica por virus de hepatitis B o virus de hepatitis C. También están involucrados factores genéticos como la alteración de la expresión de oncogenes, que son los responsables de regular la proliferación celular y apoptosis. Uno de los oncogenes más estudiados es *c-MYC*, que es un factor de transcripción, y su importancia como blanco terapéutico. La sobreexpresión de *c-MYC* en el cáncer hepático se atribuye a amplificaciones y alteraciones epigenéticas como la hipometilación de su región promotora. Por lo que se han usado fármacos epigenéticos, como inhibidores de histona deacetilasa (iHDAC), con efectos favorables como disminución de proliferación y aumento en la apoptosis. Debido a lo anterior, en esta tesis se evaluó el efecto de dos fármacos epigenéticos sobre la actividad promotora del gen *c-MYC*, específicamente los promotores P1 y P2 por ser los responsables de generar la mayor cantidad de transcrito. La estrategia experimental consistió en fusionar los promotores P1 y P2 de *c-MYC* al gen reportero luciferasa y analizar su actividad en presencia de los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida en las líneas celulares hepáticas HepG2 y Huh-7, derivadas de hepatomas humanos. Los resultados mostraron que los promotores P1, P2 y P1-P2 de *c-MYC* se encuentran activos en ambas líneas celulares, siendo P2 el de mayor actividad en la línea HepG2, y P1-P2 en las células Huh-7. Los resultados mostraron que el fármaco isotretinoína logró disminuir significativamente la actividad del promotor P2 en un 11.3% y P1-P2 en un 7% en la línea celular HepG2, pero no tuvo efecto significativo en las células Huh-7. Por su parte la talidomida no tuvo efecto significativo en la actividad de los promotores P2 y P1-P2 en ambas líneas celulares. Como conclusión se obtuvo que el fármaco isotretinoína es efectivo disminuyendo la actividad de los promotores P1 y P2 del gen *c-MYC* en la línea celular HepG2. Los resultados obtenidos abren la posibilidad para evaluar la expresión de genes blanco de *c-MYC* por efecto del fármaco isotretinoína y utilizar el sistema pGL3-Myc-P2 para analizar la actividad de *c-MYC* en respuesta a otras moléculas remodeladoras de la cromatina.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, represents an estimated 9.6 million deaths, of which 782,000 are due to liver cancer. The main environmental and biological factors that induce the development of liver cancer are excessive alcohol consumption and chronic infection with hepatitis B virus or hepatitis C virus. Genetic factors such as altered expression of oncogenes involved in regulating cell proliferation and apoptosis are also associated. One of the most studied oncogenes is *c-MYC*, its importance as a therapeutic target is based on reports that showed that the repression of *c-MYC* induced regression of hepatic tumors in murine models. Overexpression of *c-MYC* in liver cancer is attributed to amplifications and epigenetic alterations such as promoter hypomethylation. One way to modify expression of altered genes in tumor cells is through the use of epigenetic drugs, such as histone deacetylase inhibitors (HDACi), which have had favorable effects such as proliferation decreased and apoptosis. In this thesis we evaluate the effect of two epigenetic drugs on the promoter activity of *c-MYC*, specifically P1 and P2 promoters, as they are responsible for generating the greatest amount of transcript. The experimental strategy consisted of fusing the P1 and P2 promoters to the luciferase reporter gene and analyzing their activity in the presence of the epigenetic drugs isotretinoin and thalidomide, assays were performed in the hepatic cell lines HepG2 and Huh-7, derived both from human hepatomas. The results showed that promoters P1, P2 and P1-P2 of *c-MYC* are active in both cell lines, with P2 being the most active in the HepG2 line, and P1-P2 in Huh-7 cells. In both cell lines, the promoter with the least activity was P1. The results indicate that drug isotretinoin significantly reduces the activity of the P2 promoter to 11.3% and P1-P2 to 7% in HepG2 cell line, and does not have a significant effect on Huh-7 cells. The results indicate that drug isotretinoin significantly reduces the activity of the P2 promoter by 11.3% and P1-P2 by 7% in HepG2 cell line, but does not have a significant effect on Huh-7 cells. On the other hand, thalidomide had no significant effect on the activity of the P2 and P1-P2 promoters in either cell lines. We can conclude that the drug isotretinoin reduced the activity of *c-MYC* P1 and P2 promoters in HepG2 cell line. Our results open the possibility to further evaluate the expression of *c-MYC* target-genes under the effect of the drug isotretinoin and to analyze the activity of *c-MYC* in response to other chromatin remodeling drugs using using the pGL3-Myc-P2 system.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, dentro de los tipos más comunes se encuentra el cáncer de hígado y tiene el segundo lugar de causa de muerte por cáncer en todo el mundo (Mohammadian *et al.* 2018). Las principales causas son el consumo excesivo de alcohol y la infección crónica de virus de hepatitis B o C (Badvie 2000; Mohammadian *et al.* 2018; Schlaeger *et al.* 2008). A nivel genético puede ser causado por alteración en oncogenes, genes supresores de tumores y microRNAs. Los oncogenes codifican proteínas que controlan la proliferación celular y apoptosis, sus productos se pueden clasificar en factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, factores de transcripción, transductores de señales y reguladores de apoptosis, y su sobreexpresión puede resultar de mutaciones o fusión de genes, amplificaciones o yuxtaposición a elementos potenciadores (Croce 2008). Uno de los activadores más fuertes de la carcinogénesis es el oncogén *c-MYC*, al encontrarse desregulado en todos los tipos de cáncer es considerado como blanco terapéutico de gran importancia (Wahlström y Henriksson 2015). El silenciamiento de este gen puede inhibir la migración y proliferación en modelos celulares, y provocar la regresión tumoral en modelos murinos (Shachaf *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2013). Además, se ha demostrado que la activación de *c-MYC* y de genes regulados por *c-MYC* se relaciona directamente con la conversión de lesiones hepáticas preneoplásicas a carcinoma hepatocelular (Kaposi-Novak *et al.* 2009). Entre los eventos más comunes asociados con el desarrollo de cáncer hepático se encuentra la amplificación de la región 8q22-24 que incluye al gen *c-MYC* (Patil *et al.* 2005), alteraciones epigenéticas como la hipermetilación del promotor de *c-MYC* (Thorgeirsson y Grisham 2002; Tsujiuchi *et al.* 1999) y aumento en la expresión de HDAC (histona deacetilasas) 1, 2 y 3 (Buurman, *et al.* 2012; Xie *et al.* 2012). La alteración de la expresión de las HDAC causa cambios en las histonas que modifican la expresión de un gran número de genes en células malignas, estas modificaciones pueden ser reversibles y contrarrestadas con iHDAC (inhibidores de histona deacetilasas) y pueden aumentar la expresión de genes supresores de tumor o indirectamente reprimir la expresión de oncogenes (Li y Seto 2016). Además, los fármacos epigenéticos tipo iHDAC tienen efectos en la disminución de la proliferación, migración y activación de las vías de

apoptosis (Bolden *et al.* 2013; Nebbioso *et al.* 2005; Ververis *et al.* 2013). Por esta razón, en este proyecto de tesis se evaluó el efecto de dos fármacos epigenéticos de tipo iHDAC sobre la actividad del promotor del gen *c-MYC*, específicamente el promotor P1 y P2, en los modelos celulares hepáticos HepG2 y Huh-7.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer hepático

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, representa un estimado de 9.6 millones de muertes en todo el mundo, de las cuales 782,000 son por cáncer hepático (Globocan 2018). En México, el hepatocarcinoma ocupa el tercer lugar de mortalidad por cáncer, con un estimado de 6,868 muertes anuales (Globocan 2018). Tiene una alta tasa de mortalidad, lo que indica que la mayoría de los casos no sobreviven (Marengo *et al.* 2016). Generalmente se desarrolla como consecuencia de una enfermedad crónica hepática avanzada, usualmente relacionada a infección crónica por virus de hepatitis B o C, o el consumo excesivo de alcohol. Otros factores de riesgo incluyen el tabaquismo, diabetes, sobrepeso e intoxicación por aflatoxina B1 (Maucort-Boulch *et al.* 2018). La tirosinemia hereditaria que aumenta en un 40% la probabilidad de desarrollar cáncer y la esteatohepatitis no alcohólica (Badvie 2000; Bugianesi *et al.* 2002). En la mayoría de los tipos de cáncer la tasa de supervivencia es significativamente más alta cuando son diagnosticados de forma temprana y el tratamiento se recibe de inmediato, pero en el cáncer de hígado en etapas tempranas no suele generar síntomas significativos por lo que suele ser detectado en etapas avanzadas (Tsai *et al.* 2018). Los primeros síntomas suelen no ser específicos, como fiebre, anorexia náuseas; en etapas más avanzadas son seguidos de ictericia que puede conducir a insuficiencia hepática aguda (Houghton 2011). El tratamiento depende del estado de desarrollo del cáncer y salud que presente el paciente, según las pautas de la *American Cancer Society*, los principales tratamientos son la extirpación quirúrgica o trasplante parcial o total, embolización de la arteria hepática, la electrocauterización y la radioterapia (Tsai *et al.* 2018). Principalmente se recomiendan las opciones quirúrgicas, pero solo del 10% al 23% de los pacientes son candidatos a estos tratamientos (Dhir *et al.* 2012; Shah *et al.* 2011), y aún así el pronóstico no es bueno. En pacientes con cáncer hepático en etapas iniciales que son sometidos a trasplante de hígado la supervivencia general a 5 años es del 44% al 78%, en los pacientes sometidos a resección hepática la tasa de supervivencia a 5 años es de 27% a 70% (Dhir *et al.* 2012). Cuando el cáncer es detectado en etapas avanzadas y el paciente no se somete a tratamiento la supervivencia es menor a 6 meses (Board 2018). La complejidad que implica

desarrollar un tratamiento efectivo contra el cáncer son los eventos genéticos que contribuyen a su inicio y progresión, entre estas alteraciones se encuentran mutaciones, cambios en la estructura del genoma y alteraciones epigenéticas.

2.2. Factores genéticos que contribuyen al desarrollo de cáncer hepático

Los cambios genéticos que contribuyen al desarrollo del cáncer son alteraciones secuenciales que involucran muchos oncogenes, genes supresores de tumores o microRNAs. Rara vez un cambio genético es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno, y generalmente estos eventos son de origen somático, aunque si se originan en la línea germinal pueden predisponer a una persona a desarrollar cáncer hereditario. Los genes supresores de tumores son genes que se encuentran regulados a la baja en células cancerosas, como TP53, que está involucrado en el arresto del ciclo celular por respuesta a daño en el DNA, pero se han detectado mutaciones que interrumpen su función en más del 30% de los casos (Lee y Rho 2000; Meng *et al.* 2014). Otro gen supresor de tumores relacionado con hepatocarcinoma por mutaciones de pérdida de función es ARID1A, este gen codifica para una proteína que forma complejos con proteínas como BAF (*BRG1-associated factor*), SWI/SNF (subfamily of a switch/sucrose non-fermentable) y está involucrada en la remodelación de la cromatina dependiente de ATP (Lee 2015). Otros eventos que también pueden alterar la expresión de los genes son las modificaciones epigenéticas, como la metilación aberrante del gen supresor de tumores PAX5 en tumores hepáticos (Mžik *et al.* 2016) y la sobreexpresión de HDAC. En pacientes con niveles altos HDAC1 se relaciona con una mayor incidencia de invasión de células en la vena porta, diferenciación histológica pobre y un estadio TNM (escala de estadiaje de cáncer) más avanzado (Rikimaru *et al.* 2007). El aumento de HDAC2 se relaciona directamente con la proliferación del carcinoma hepatocelular por la desregulación de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular como la ciclina D1, CDK2 y CDK4, además de inhibir a inhibidores del ciclo como p16^{INK4A} y p21^{WAF1} (Noh *et al.* 2011). Otras modificaciones epigenéticas involucran miRNAs, como es el caso de miR-615-5p y miR-17-5p, que se expresan de forma restringida en tejidos de tumores hepáticos, lo que ocasiona expresión elevada de E2F-1 y *c-MYC* que da como resultado aumento en el crecimiento celular (El Tayebi *et al.* 2012, 2013). Por otra parte, alteraciones en oncogenes son caracterizadas por estar

regulando a la alza su expresión o por estabilizar sus productos proteicos, como por ejemplo, el gen de la β -catenina (CTNNB1), el cual es uno de los principales oncogenes involucrados en el desarrollo de cáncer hepático. Mutaciones en el gen CTNNB1 pueden resultar en la producción de proteína β -catenina resistente a la degradación por proteosoma, que ocasionan una activación aberrante de la ruta Wnt, permitiendo la activación de genes involucrados en la proliferación como CCND1, que codifica para la ciclina D (Khalaf *et al.* 2018). Otro gen que se encuentra mutado en la mayoría de las células cancerosas y en más del 50% de casos de hepatocarcinoma es TRET (transcriptasa inversa), es esencial para mantener la longitud de los telómeros, siendo la mutación puntual más frecuente G> A en la posición -124 en el 93% de los casos (Lee 2015). Aunque la sobreexpresión de este gen se asocia principalmente al consumo de alcohol y a la infección crónica por virus de hepatitis C, la infección por virus de hepatitis B también puede activar TRET por la integración recurrente en su promotor. (Sung *et al.* 2012). También la sobreexpresión de los genes a menudo se relaciona con amplificaciones, tal es el caso de VEGFA, CCND1, MET y *c-MYC* (Fujimoto *et al.* 2016; Guichard *et al.* 2012; Jhunjhunwala *et al.* 2014). La sobreexpresión de *c-MYC* juega un papel importante en la patogénesis del carcinoma hepatocelular, y se ha demostrado que su inhibición ocasiona regresión en el crecimiento tumoral (Lin *et al.* 2010; Posternak y Cole 2016; Shachaf *et al.*, 2004), por lo que es considerado un objetivo terapéutico atractivo.

2.3 Características y función de *c-MYC*

El proto-oncogén *c-MYC* es un factor de transcripción clave en la regulación del ciclo celular, crecimiento, diferenciación y apoptosis (Marhin *et al.* 1997; Barr *et al.* 1998; Dang *et al.* 2006), se localiza en el cromosoma 8 humano (Dalla-Favera *et al.* 1982), y consiste en tres exones. El exón 1 de *c-MYC* es una región no traducida, y los exones 2 y 3 que contienen las secuencias codificantes (Facchini y Penn 1998). Como se muestra en la figura 1, la proteína codificada por este gen contiene dos regiones conservadas en el extremo amino, *c-MYC* box I (MBI) y *c-MYC* box II (MBII) (Cole 1986; Liao y Dickson 2000). Mientras que en el extremo carboxilo de *c-MYC* contiene tres dominios estructurales, el dominio Zip (leucine zipper), el dominio HLH (helix-loop-helix motif) y el dominio B, rico en aminoácidos básicos

(Blackwell *et al.* 1990). El dominio HLH/LZ es el sitio de dimerización con otro factor transcripcional nombrado Max (Myc-associated factor X) (Blackwood y Eisenman 1991).

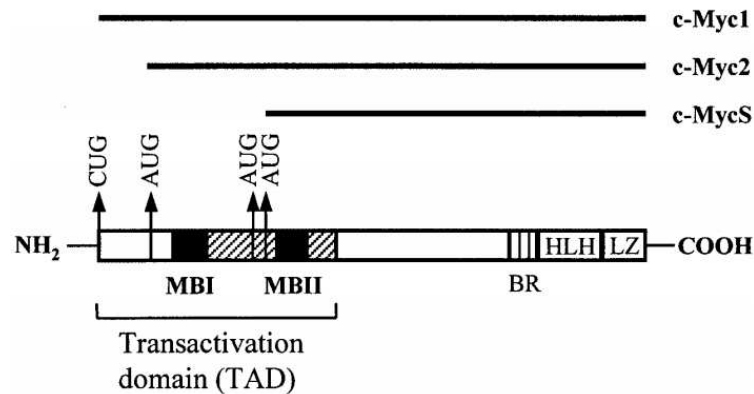


Figura 1. Diagrama esquemático de las proteínas de la familia *c-MYC*. En la parte superior del esquema se muestran los transcritos generados a partir del gen *c-MYC* (c-Myc1, c-Myc2 y c-MycS). NH₂ y COOH son las regiones amino- y carboxilo-terminal, respectivamente. Dentro del dominio de transactivación (TAD) se encuentran dos regiones altamente conservadas entre los miembros de la familia Myc; estas regiones se denominan cajas de homología de Myc I y II (MBI y MBII). Las abreviaciones BR, HLH y LZ corresponden a los dominios proteicos de región básica, helix-loop-helix y leucine zipper, respectivamente. Los codones CUG y AUG indicados son los sitios de inicio de la traducción. Tomado de Liao y Dickson 2000.

El gen *c-MYC* es de expresión inmediata temprana, en su entrada al ciclo celular es rápidamente inducido por mitógenos (transición de G₀ a G₁) y después su expresión disminuye y permanece constante durante todo el ciclo celular en proliferación continua (Hann *et al.* 1985). Su expresión también dependerá de estímulos anti-proliferativos o factores de crecimiento (la diferenciación conducirá a una disminución en la expresión de *c-MYC*) (Wierstra y Alves 2008).

El mecanismo para la activación transcripcional por *c-MYC* es mediante la formación del complejo con la proteína Max, y el reconocimiento de las denominadas cajas E (CA(C/T)GTG) que se encuentran en la región promotora de los genes blanco como se muestra en la figura 2 (Blackwell *et al.* 1993).

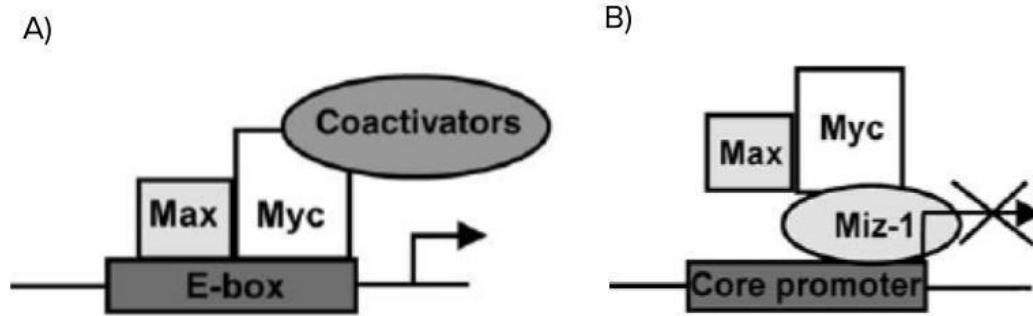


Figura 2. Mecanismo de activación y represión de *c-MYC*. A) La activación transcripcional mediada por *c-MYC* requiere de la formación de un complejo con la proteína MAX, que es capaz de reconocer las cajas E localizadas en la región promotora de sus genes blanco. B) *c-MYC* puede reprimir la transcripción de genes por unión indirecta de DNA y dímeros de *c-MYC* / Max a través de la proteína Miz-1. Adaptado de: Kiessling *et al.* 2006.

Otro mecanismo de acción menos utilizado es el de represión, pero en este se ve involucrada la proteína Miz-1 y otros elementos iniciadores (Inr) (Kleine-Kohlbrecher *et al.* 2006). Sin embargo, aún no está completamente definido como *c-MYC* reprime o activa todos los genes que están bajo su control, empezando por la auto-regulación que tiene sobre su propio gen. Lo anterior es una de las características de las células cancerosas, la pérdida de la capacidad de autorregulación (Nishikura *et al.* 1983; Penn *et al.* 1990). Una de las vías importantes que regulan *c-MYC* es WNT/ β -catenina, además de que existen evidencias clínicas que han demostrado que hay una expresión aberrante en la señalización de esta vía en el inicio del carcinoma hepatocelular (Csepregi *et al.* 2008). El gen *c-MYC* se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer hepático. Se ha demostrado que la represión de este único gen es capaz de inducir la regresión sostenida del tumor, así como la diferenciación de las células tumorales, esto en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones transgénicos (Jain *et al.* 2002).

2.3.1. Promotores de *c-MYC*

El gen *c-MYC* contiene cuatro promotores, llamados P0, P1, P2 y P3 como se describe en la Figura 3.

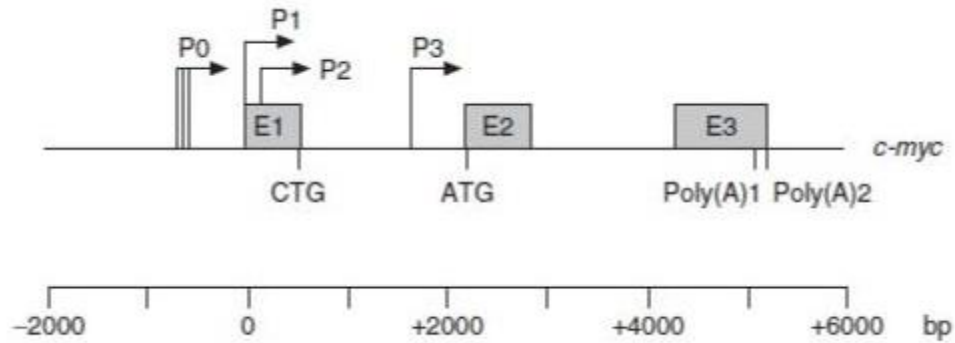


Figura 3. Gen *c-MYC* humano. El esquema representativo de *c-MYC* muestra los exones (cajas grises E1, E2 y E3), promotores (P0, P1, P2 y P3), sitios de inicio de la traducción (CTG, ATG), sitios de poliadenilación Poly(A)1 y Poly(A)2. Tomado de Wierstra y Alves, 2008.

Los promotores P0 y P3 no contienen caja TATA y transcriben menos del 5% del mRNA de *c-MYC*. El promotor P0 se localiza de 550 a 650 pb al extremo 5' del promotor P1, y el promotor P3 se posiciona cerca del extremo 3' del intron I (Bentley y Groudine 1986). Los transcritos generados por P0 y P3 son de 3.1 y 2.3 kb, respectivamente (Bentley y Groudine 1986). La transcripción de *c-MYC* está a cargo principalmente de P1 y P2, los cuales se encuentran separados por 161 pb en el exón 1 del gen humano (Bernard *et al.* 1983). Estos promotores contienen una caja TATA, mientras que un fuerte elemento Inr (sensible a la estimulación por USF (upstream stimulatory factor) (Lee y Ziff 1999) tiene lugar únicamente en el sitio de inicio de la transcripción de P2 y generan transcritos de 2.4 y 2.2 kb, respectivamente (Bernard *et al.* 1983; Facchini y Penn 1998) (Figura 4). En células no tumorales del 75 al 90% de la transcripción de *c-MYC* está a cargo del promotor P2 y del 10-25% por el promotor P1 (Stewart *et al.* 1984).

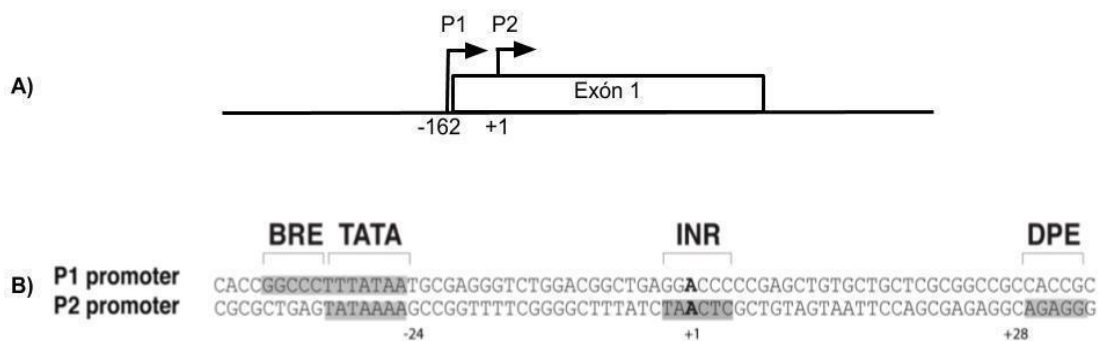


Figura 4. Promotores P1 y P2 del gen *c-MYC*. A) Esquema representativo de los promotores P1 y P2 del gen *c-MYC*. +1, sitio de inicio de la transcripción del promotor P2. B) Principales (cont.)

(cont.) elementos de los promotores P1 y P2. El promotor P1 tiene una caja TATA y un motivo BRE (TFIIB recognition element), el promotor P2 posee una caja TATA fuerte, una secuencia iniciadora (INR) y un motivo DPE (downstream core promoter elements). Adaptado de: Bardales *et al.* 2018.

2.3.2. Promotores P1 y P2

Aunque *c-MYC* tiene múltiples promotores se reporta que la transcripción está a cargo principalmente por los promotores P1 y P2, puede hablarse de ellos como un promotor dual, ya que tienen la posibilidad de tener un control diferente cada uno, pero por su cercanía también pueden tener un vínculo en su regulación (Wierstra y Alves, 2008; Albert *et al.* 2001).

Como se mencionaba anteriormente el promotor P1 está encargado de un reducido porcentaje de la transcripción de *c-MYC*, dentro de los antecedentes directos del proyecto se encuentra la evaluación de la actividad promotora P1 (pGL3-P1-Myc-S) en células Hepa-1 en donde se encontró que no había diferencia significativa comparado con el control sin promotor (pGL3-Basic Vector, Figura 5) (Barraza-Reyna, P. 2016).

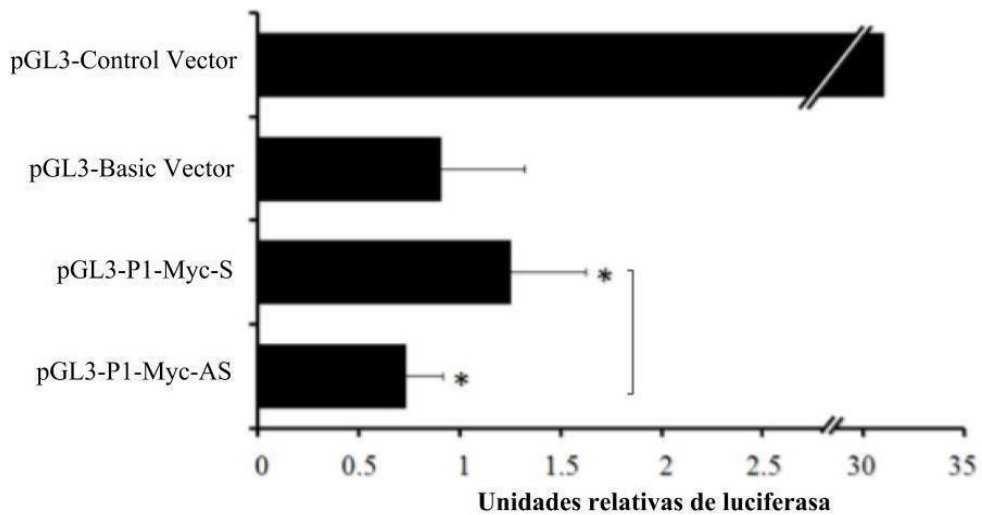


Figura 5. Actividad del promotor P1 del gen *c-MYC* humano en células Hepa-1. Las unidades relativas de luciferasa son valores arbitrarios y fueron establecidos en relación a la actividad luciferasa de la construcción pGL3-P1-Myc-S (Valor de 1). pGL3-P1-Myc-S, contiene el promotor P1 en dirección sentido. pGL3-P1-Myc-AS, contiene el promotor P1 en dirección antisentido. Se muestra la actividad de luciferasa de los controles positivo (pGL3-Control Vector) y negativo (pGL3-Basic Vector). *Se encontró diferencia significativa utilizando la prueba U de Mann-Whitney, $P < 0.05$. (Tomado de Barraza-Reyna, 2016).

Uno de los elementos que regulan tanto a P1 como a P2 es una región rica en GC, conocida como elemento CT (CCCTCCCC), localizado de -142 a -115 al extremo 5' del promotor P1. El promotor P1 es el principal regulador de la expresión de *c-MYC* mediante la formación de G-quadruplex y el motivo I (Dai *et al.* 2010; Strobl *et al.* 1992; Pullner *et al.* 1996). Es necesaria la presencia de esta secuencia intacta para la activación de la transcripción de ambos promotores (Desjardins y Hay 1993). Por otra parte, cada promotor tiene elementos que pueden controlar de manera independiente la expresión de cada uno, por ejemplo, el sitio ME1a1 en la posición 240 y un sitio de unión a E2F en la posición 258 con relación al sitio de inicio de la transcripción de P2 son necesarios para la actividad de P2 (Bossone *et al.* 1992; Hamel *et al.* 1992; Moberg *et al.* 1992; Facchini *et al.* 1997). El factor de transcripción Sp1 puede activar al promotor *c-MYC* a través de 5 sitios, teniendo gran afinidad por el sitio -44 (posicionado a -44 relativo al sitio de inicio de la transcripción de P1). El elemento CT, por el contrario, tiene menor afinidad por los sitios ME1a2, ME1a1/CT-I2 y distal, siendo los sitios de unión -44, distal y el elemento CT capaces de activar al promotor P1 (Geltinger *et al.* 1996). El elemento CT-I2 es necesario para la transactivación del promotor P2 (Majello *et al.* 1995). Los promotores P1 y P2 de *c-MYC* tienen múltiples sitios de unión para factores de transcripción que regulan su actividad, la cual a su vez puede ser regulada por modificaciones epigenéticas.

2.4. Alteraciones en *c-MYC* en cáncer hepático

El oncogén *c-MYC* está estrechamente relacionado con la patogénesis del cáncer hepático. Se ha demostrado que la transformación maligna de lesiones hepáticas preneoplásicas coincide con la firma de expresión regulada por *c-MYC* (Kaposi-Novak *et al.* 2009). Estudios realizados por Tsujiuchi y colaboradores demostraron que en tumores hepáticos inducidos en modelos murinos, los sitios CpG río arriba del oncogén *c-MYC* se encontraban sin metilar, mientras que en muestras de hígado sano y nódulos hiperplásicos todos los sitios estaban metilados. Además, en las muestras de tumores hepáticos había un aumento en la expresión de *c-MYC* en comparación con las muestras control. Estos resultados sugieren que la metilación aberrante

ocasiona la sobreexpresión de *c-MYC* que tiene papel importante en la transformación de nódulos hiperplásicos a hepatocarcinoma (Tsujiuchi *et al.* 1999). Otros eventos relacionados con la sobreexpresión de *c-MYC* son las ganancias cromosómicas de la región 8q22-24, presentes en etapas tempranas y avanzadas (Kaposi-Novak *et al.* 2009). Estas ganancias cromosómicas están relacionadas a la etiología de la enfermedad, siendo más frecuentes en hepatocarcinoma asociado a infección por VHC, VHB y consumo de alcohol (Schlaeger *et al.* 2008).

La expresión de *c-MYC* también puede ser afectada por eventos epigenéticos como alteraciones en la expresión de miRNAs. Lin y colaboradores demostraron que miR-744, que tiene como objetivo directo *c-MYC*, se encuentra frecuentemente regulado a la baja en células y tejidos de cáncer hepático, y su restauración ocasiona una disminución significativa en el crecimiento celular (Lin *et al.* 2014). También hsa-let-7g regula a *c-MYC*, funciona como un gen supresor de tumores, pero en las células modelo de cáncer hepático HepG2, Hep3B y Huh7, se encuentra reprimido (Lan *et al.* 2011).

2.5. *c-MYC* como blanco terapéutico

La expresión de *c-MYC* trae consigo la activación de cascadas mitogénicas que se encuentran activas en células tumorales. El gen *c-MYC* se encuentra sobreexpresado en todos los tipos de cáncer, además de cáncer de hígado y se ha demostrado que su represión o silenciamiento promueve efectos favorables como disminución de la proliferación y regresión tumoral, por lo que es considerado un blanco terapéutico importante. Entre los reportes de los efectos de la represión de *c-MYC* se encuentra inhibición de la migración celular, invasión y proliferación en células HepG2 por el silenciamiento de *c-MYC* utilizando RNAi (Zhao *et al.* 2013).

En modelos murinos la represión de *c-MYC* se ha visto relacionada con la reducción de mRNA y proteína CD47 y PD-L1, mejorando la respuesta inmune antitumoral (Casey *et al.* 2016).

La primera evidencia de que la represión de *c-MYC* puede usarse como una estrategia para tratar el cáncer hepático proviene de un modelo murino que expresa *c-MYC* de manera condicional, en el que la inactivación de *c-MYC* indujo la regresión del crecimiento de tumores hepáticos y diferenciación (Shachaf *et al.* 2004). Dentro de las estrategias desarrolladas y probadas *in vitro* se ha propuesto el uso de nucleótidos

antisentido contra *c-MYC* que han demostrado inhibir el crecimiento de células HepG2 (Simile *et al.* 2004). Otras estrategias involucran moléculas que interfieren con la heterodimerización de *c-MYC/Max*, como 10058-F4, que impide la formación del complejo y además reprime la actividad de hTERT *in vitro*, mostrando efectos como disminución de la viabilidad en células HepG2 y Hep3B (Lin *et al.* 2007). La desventaja que presentan estas estrategias son el metabolismo rápido de las células que impide que lleguen a concentraciones suficientes a los tumores (Guo *et al.* 2009). Uno de los desafíos presentados en el modelo transgénico presentado por Shachaf y colaboradores es que la reactivación de *c-MYC* ocasiona un nuevo crecimiento tumoral, a diferencia de la regresión sostenida que ocurre por la breve inactivación de *c-MYC* en otros tipos de cáncer, como en el caso de linfoma en que la inactivación resulta en una pérdida permanente del fenotipo neoplásico principalmente por aumento en la apoptosis (Felsher *et al.* 1999). En osteosarcoma, la inactivación de *c-MYC* reduce la proliferación e induce principalmente la diferenciación sin presentar consecuencias al reactivar el gen (Jain *et al.* 2002). En las células de hepatocarcinoma, el efecto principal es la diferenciación para más tarde generar apoptosis gradual. Las células parecen permanecer en un estado de dormancia que les permite diferenciarse por completo y adquirir las características de hepatocitos normales y células biliares (Shachaf *et al.* 2004), por lo que debe ser necesario para identificar una estrategia terapéutica una combinación con otros agentes como la quimioterapia, radioterapia o agentes que sean dirigidos contra otras vías afectadas durante el proceso de la carcinogénesis, además de *c-MYC*. El uso de fármacos epigenéticos permiten regular la expresión génica, en particular, los de la clase iHDAC (inhibidores de histona deacetilasa) pueden revertir modificaciones epigenéticas aberrantes y reactivar genes supresores de tumores que a su vez afectan la expresión de otros genes. Además, se han reportado efectos favorables en células cancerosas como arresto del ciclo celular, aumento en la diferenciación y apoptosis (Ververis *et al.* 2013).

Debido a que el reposicionamiento de fármacos es una estrategia que además de reducir periodos de desarrollo, disminuye riesgos por que ya están establecidos sus perfiles farmacocinéticos y de seguridad, en esta tesis se propone evaluar el efecto de dos fármacos epigenéticos de la clase iHDAC sobre la actividad promotora de *c-MYC*.

2.6. Inhibidores de histona deacetilasa (iHDAC)

Las HDAC tienen un papel importante en la regulación de la expresión génica y las alteraciones en la acetilación de las histonas están relacionadas con el desarrollo de cáncer. Las HDAC, además de las histonas, son capaces de desacetilar proteínas no histonas (Choudhary *et al.* 2009) y en células cancerosas es común encontrar una alta desregulación en los patrones de acetilación (Parbin *et al.* 2014). Las modificaciones hechas por HDACs son reversibles e implican cambios en la expresión de genes que no afectan su secuencia de DNA (Ungerstedt *et al.* 2005). El uso de moléculas iHDAC permiten restablecer la acetilación de proteínas y reactivar genes supresores de tumores y tienen como efecto, aumento en la apoptosis, diferenciación e inhibición de la angiogénesis y metástasis. Otro efecto favorable es que la sensibilidad a apoptosis es mayor en las células cancerosas que en células sanas que son sometidas a iHDAC, en algunos casos la actividad es selectiva en la activación de esta vía (Nebbioso *et al.* 2005, 2017; Ungerstedt *et al.* 2005).

Dependiendo de su estructura química se dividen en cuatro grupos hidroxamatos, benzamidas, ácidos grasos de cadena corta y péptidos cíclicos (Li y Seto 2016). El mecanismo común de los iHDACs es la inhibición de la función enzimática de las HDACs, por la unión con el ion Zn^{2+} que se localiza en su sitio activo. Las moléculas pueden estar dirigidas hacia las clases I (HDACs 1, 2, 3 y 8), II (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 y 10), III (enzimas independientes de zinc, pero dependientes de NAD (*nicotinamide adenine dinucleotide*)) o IV (HDAC 11), y también pueden tener efectos muy variables en la especificidad de la acetilación de sustratos no histona (Lane y Chabner 2009; Li y Seto 2016). Al inhibirse la actividad de las enzimas HDAC se favorecen los eventos de acetilación que conduce a un aumento en la actividad de transcripción lo que puede cambiar drásticamente algunos fenotipos celulares. Los cambios epigenéticos pueden ser por mecanismos directos o indirectos. El mecanismo directo es a través de la interacción con proteínas que se dirigen a secuencias específicas de DNA. Los efectos indirectos son causados por la interacción del fármaco con receptores de superficie celular, proteínas que alteran su expresión, factores de crecimiento, factores de transcripción que posteriormente causan cambios en la estructura de DNA y su expresión (Csoka y Szyf 2009). Existen numerosos iHDAC en desarrollo y algunos ya han sido aprobados por la FDA, entre ellos se encuentra vorinostat, aprobado en el 2006, indicado como

tratamiento para linfoma cutáneo de células T. Belinostat, aprobado en el 2014 indicado para linfoma periférico de células T, ambos con especificidad no selectiva (Clases I, II y IV) (McDermott y Jimeno 2014). Romidepsin está indicado para ambos tipos de linfoma, cutáneo y periférico, pero tiene especificidad dirigida a la clase I (Frye *et al.* 2012).

En esta tesis la selección de los fármacos prueba se realizó con base en el cuadro básico de medicamentos del sector salud, se identificaron 987 con potencial uso en cultivo celular, de los cuales se seleccionaron en base a la literatura dos con actividad epigenética iHDAC, isotretinoína y talidomida (Glaser 2007; Zahran *et al.* 2014). Estos dos fármacos han demostrado disminuir significativamente la expresión de *c-MYC* en células HepG2 (Figura 6) (Aguirre-Vázquez, 2017, datos no publicados), por lo que se utilizaron para evaluar su efecto en la actividad de la región promotora de *c-MYC*.

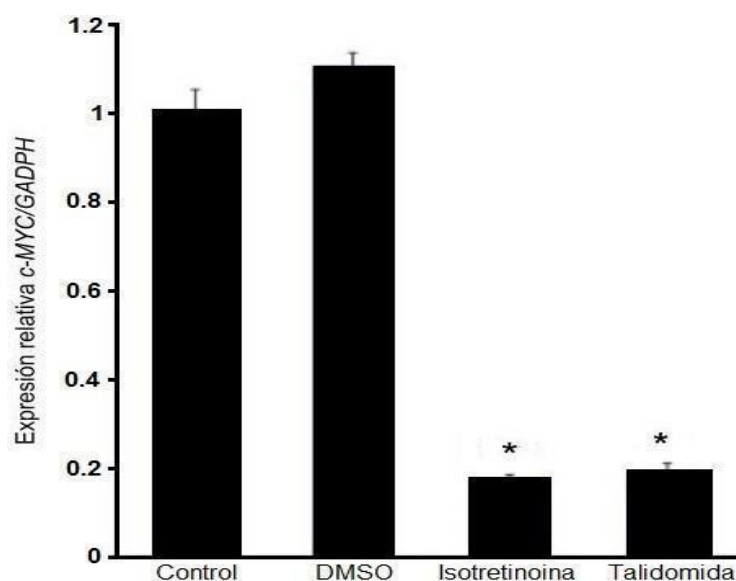


Figura 6. Evaluación de la expresión del gen *c-MYC* por efecto de fármacos epigenéticos en células HepG2. La expresión de *c-MYC* se realizó en presencia de isotretinoína 10 μ M y talidomida 10 μ g/mL, El control corresponde a células cultivadas en medio esencial mínimo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA), DMSO corresponde a células cultivadas en medio con DMSO 0.1%. * $P < 0.001$. (Tomado de: Aguirre-Vázquez, 2017, datos no publicados).

2.7. Inhibidores de las DNA metiltransferasas (iDNMT)

En el DNA existen islas CpG que poseen regiones ricas en GC. Las CpG metiladas en regiones promotoras reprimen la expresión génica, la metilación del DNA

genómico es catalizada por DNA metiltransferasas (Dnmts) que incluyen Dnmt1 (Lei *et al.* 1996), Dnmt3a (Gowher y Jeltsch 2001), y Dnmt3b (Aoki *et al.* 2001). La conversión de las citocinas en 5'-metilcitocinas por la acción de las DNA metiltransferasas con S-adenosil metionina (SAM) como metilo donante (Nasu 2011). La hipometilación de los genes incluidos *c-MYC* se asocia con eventos tempranos de carcinogénesis tanto en humanos como en modelos murinos y además se asocia con la progresión a fase metastásica (Tao *et al.* 2000). La isotretinoína además de tener actividad iHDAC también se ha reportado que tiene actividad de iDNMT específicamente de las Dnmt1 y Dnmt3a (Kuriyama *et al.* 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de muerte siendo el cáncer hepático uno de los más agresivos. El cáncer hepático en México ocupa el tercer lugar de mortalidad, con un estimado de 6,868 muertes al año (Globocan 2018). Hasta el momento no existe tratamiento efectivo contra el cáncer hepático, lo más recomendado es la extirpación quirúrgica o el trasplante parcial o total, pero la disponibilidad de donantes es muy limitada y el pronóstico es pobre en todos los casos. Por esta razón es necesario buscar fármacos que permitan tratar al cáncer hepático y, particularmente, reprimir la expresión de *c-MYC*, uno de los oncogenes que se encuentra sobreexpresado en este tipo de cáncer y cuya represión podría reducir el crecimiento tumoral, para ello es indispensable contar con un modelo experimental que nos sirva para identificar la actividad transcripcional del promotor de *c-MYC* por efecto de los fármacos.

4. HIPÓTESIS

Los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida, del tipo iHDAC, son capaces de reducir la actividad promotora del gen *c-MYC* en células hepáticas.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo general

Evaluar la actividad promotora del gen *c-MYC* humano en líneas celulares hepáticas expuestas a los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida.

5.2. Objetivos particulares

1. Evaluar la actividad de los promotores P1 y P2 de *c-MYC* en las líneas celulares HepG2 y Huh-7.
2. Determinar la actividad de los promotores P1 y P2 de *c-MYC* en las líneas celulares HepG2 y Huh-7 por efecto de los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Construcciones plasmídicas

La evaluación de la actividad promotora del gen *c-MYC* se realizó utilizando construcciones que tienen como base el vector pGL3 Basic, que contiene el gen reportero luciferasa (Promega, Madison, WI. USA). El vector pGL3-Myc-P1 que contiene el promotor P1 de *c-MYC* de 1337pb fue previamente purificado y caracterizado (Barraza-Reyna, 2016). Los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 que contienen el promotor P2 de 142 pb y el promotor P1-P2 de 2530 pb, respectivamente, fueron donados por el Dr. Michael Cole (Norris Cotton Cancer Center, New Hampshire, EE.UU.) (Figura 7).

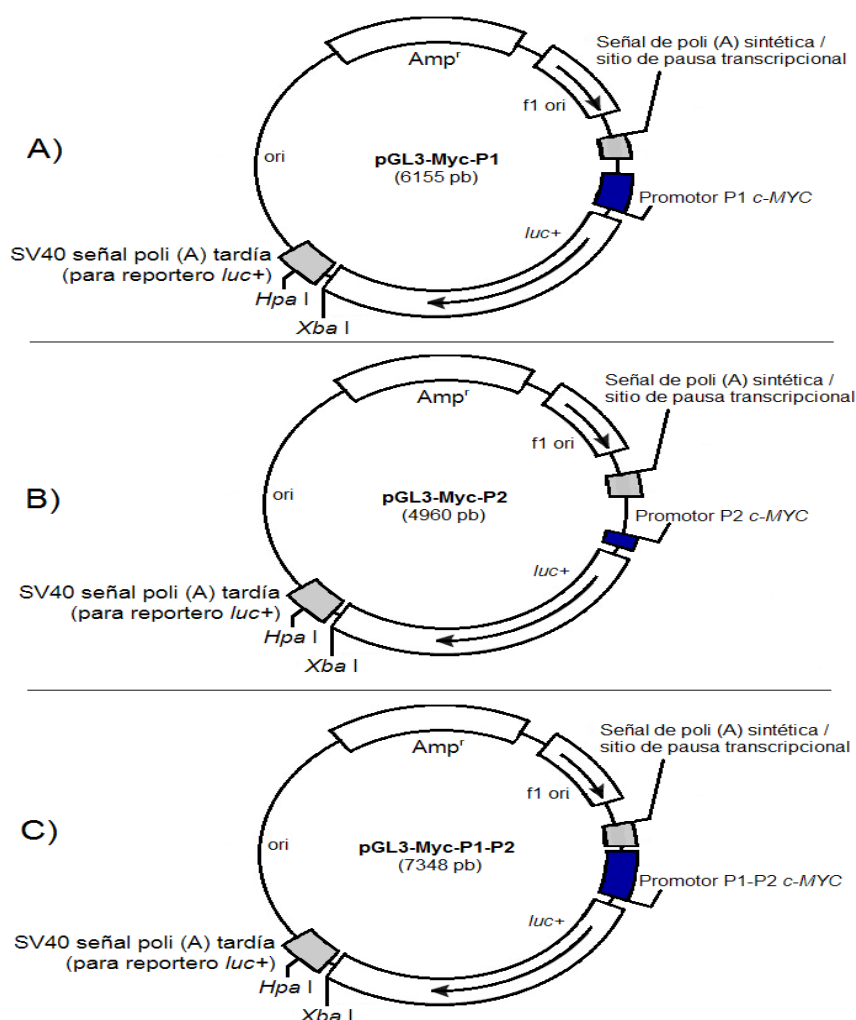


Figura 7. Construcciones pGL3-promotor *c-MYC*. Esquema de los plásmidos pGL3 con los promotores de *c-MYC*. A) pGL3-Myc-P1, contiene el promotor P1 de 1337 pb (-96 +125, respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor P2), B) pGL3-Myc-P2, contiene el promotor P2 de 142 pb (-92 +50), C) pGL3-Myc-P1-P2 contiene el promotor P1-P2 de 2530 pb (-2480 +50). Amp^r: (cont.)

(cont.) gen β -lactamase; luc+: Gen luciferasa; fl ori: origen de replicación derivado de fagos filamentosos; ori: origen de replicación en *E. coli*.

6.2. Transformación de bacterias competentes

Los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 fueron donados por el Dr. Michael Cole (Norris Cotton Cancer Center, New Hampshire, EE.UU.). Se recibieron en papel filtro y fueron resuspendidos en 25 μ L de buffer TE, de las cuales se utilizaron 8 μ L para la transformación en bacterias competentes DH5 α . La mezcla de *E. coli* competentes por cloruro de rubidio con el DNA plasmídico se incubó durante 1 h en hielo y posteriormente se realizó choque térmico durante 90 s a 42 °C. Después se colocaron los tubos durante 2 min en hielo y se añadió 1 mL de medio Luria Bertani (LB) a temperatura ambiente. Posteriormente las células se incubaron a 37 °C durante 1 h en agitación constante a 700 rpm. Para la siembra se colocaron 100 μ L de cada mezcla en placas LB con ampicilina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

6.3. Extracción de DNA plasmídico

Las bacterias transformadas con los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 se inocularon de manera independiente en 3 mL de medio LB con ampicilina, y se mantuvieron en agitación constante a 37 °C durante toda la noche. Se transfirieron 1.5 mL de cada cultivo a un tubo estéril y se centrifugó durante 30 s a 4 °C a máxima velocidad. Se eliminó el sobrenadante y se repitió la operación con el medio restante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 750 μ L de STE frío (Tris HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 0.1M, EDTA 1mM pH 8.0) y se centrifugó a máxima velocidad durante 30 s. El STE se removió por aspiración y se resuspendió el precipitado en 100 μ L de solución alcalina I fría (Tris.HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM). Después, se agregaron 200 μ L de solución de lisis alcalina II (NaOH 0.2M, SDS 1%) preparada justo antes de utilizarse. Manteniendo el tubo en hielo se agitó por inversión 5 veces y después se agregaron 150 μ L de solución de lisis alcalina III fría (Acetato de potasio 3M pH 4.5), se mezcló por inversión y se almacenó en hielo durante 5 min. El lisado bacteriano se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura

ambiente durante 2 min. El tubo se centrifugó a máxima velocidad por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó por aspiración y se agregó 1 mL de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min a 4 °C. El sobrenadante se removió por aspiración y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. El DNA plasmídico se resuspendió en 20 µL de TE 1× (pH 8.0) con 1 µL de RNAsa A (20 µg/mL).

6.4. Caracterización enzimática

Los vectores plasmídicos se caracterizaron mediante digestión enzimática. Para la reacción se utilizó 1 µL de DNA plasmídico (pGL3-Myc-P2), 1 µL de enzima *XhoI* (10,000 U/ µL, New England Biolabs, Ipswich MA. USA), 1 µL de enzima *XbaI* (10,000 U/ µL, New England Biolabs, Ipswich MA. USA), 3 µL de Buffer 2 (New England Biolabs, Ipswich MA. USA) y 24 µL de agua libre de nucleasas. La caracterización de pGL3-Myc-P1-P2 se realizó utilizando 1 µL de DNA plasmídico, 1 µL de enzima *XhoI* (New England Biolabs), 3 µL de Buffer 2 (New England Biolabs) y 25 µL de agua libre de nucleasas. Las mezclas se dejaron incubando a 37 °C toda la noche y el producto de la digestión se visualizó en gel de agarosa teñido con Gel Red (Biotium Fremont, CA. U.S.A.).

6.5. Purificación de DNA plasmídico

La purificación del DNA plasmídico se realizó utilizando el QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, DEU) siguiendo las instrucciones del proveedor. Primero se inocularon de manera independiente 3 mL de medio LB-ampicilina con bacterias transformadas con los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2; ambos cultivos se mantuvieron en agitación vigorosa a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, de manera independiente se inocularon 100 mL de medio LB-ampicilina con los 3 mL inoculados anteriormente y se incubaron toda la noche en las mismas condiciones. Para colectar las células, se agregó el cultivo a tubos de 50 mL y se centrifugaron durante 15 min a 6,000 g a 4°C, se desechó el sobrenadante, se agregó el medio de cultivo restante y se repitió la operación. Después la pastilla celular se resuspendió en 4 mL de buffer P1 y se agitó en vórtex, se agregaron 4 mL de buffer P2 y se mezcló por inversión 6 veces, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y después se agregaron 4 mL de buffer P3. Después, el tubo se mezcló por

inversión y se incubó durante 15 min en hielo. Los tubos se centrifugaron a 7,000 g durante 30 min a 4° C. Se tomó el sobrenadante, se colocó en tubos de 15 mL y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. En un tubo nuevo de 50 mL se colocó la columna de intercambio iónico y se equilibró agregando 4 mL de buffer QBT permitiendo el paso del flujo por gravedad, posteriormente se agregó a la columna el sobrenadante y después de que pasó todo el flujo, se agregaron 20 mL de Buffer QC. Después se cambió la columna a un tubo nuevo de 15 mL y se agregaron 5 mL de Buffer QF precalentado a 65°C. A los tubos con la elución del DNA se les agregó 3.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente, se centrifugó durante 30 min a 15,000 g y se desechó el sobrenadante. Se agregó etanol al 70% y se centrifugó a 15,000 g durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante unos minutos y finalmente se resuspendió en 200 µL de agua libre de nucleasas.

6.6. Secuenciación

En los ensayos de secuenciación se utilizó el Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Para el marcaje de la región promotora del vector pGL3-Myc-P2 se realizó una reacción donde se utilizó 1 µL del primer Rvprimer3 (Promega, Madison, WI, USA) mientras que para la región promotora de pGL3-Myc-P1-P2 se realizaron dos reacciones en las que se agregó de manera individual 1 µL de los *primers* Rvprimer3 (Promega) y Glprimer2 (Promega, Madison, WI, USA). Cada reacción contenía 4 µL de 5× Sequencing Buffer, 4 µL de Ready Reaction Mix, 0.5 µL DNA plasmídico [500 ng/µL] y 10.5 µL de agua libre de nucleasas. El proceso se realizó en un termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems, CA, USA).

Después del marcaje cada reacción se precipitó con etanol añadiendo 2 µL de EDTA 125 mM, 2 µL de acetato de sodio 3 M y 5 µL de etanol al 100% a cada tubo. Se agitaron en vórtex todos los tubos y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron los tubos durante 30 min a 2,500 g a 4 °C. Se realizó un lavado con 70 µL de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente durante 15 min a 1,650 g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se realizó nuevamente el lavado

con etanol al 70% y la centrifugación a 1,650 g. Por último, se eliminó el sobrenadante, y las muestras fueron guardadas a 4 °C.

La resuspensión de las muestras se realizó con 10 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Carlsbad, CA. USA) y se incubaron por 2 min a 95 °C en termociclador para su desnaturalización seguido por una incubación en hielo durante 5 min. Se colocaron 10 µL de cada reacción en una placa de 96 pozos y se llevó a cabo la secuenciación en un analizador genético 3130x1 (Applied Biosystems, CA, USA). El electroferograma obtenido se comparó con la secuencia de referencia (NG_007162).

6.7. Modelo celular

La línea celular HepG2 (ATTC, HB-8065), derivada de hepatoma celular de un hombre caucásico de 15 años de edad, referida también como hepatoblastoma (PubMed: 19751877) fue cultivada en medio esencial mínimo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA) como base y complementado con suero fetal bovino a un concentración del 10%, glucosa 4.5 g/L y 1% de aminoácidos no esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids Solution, Thermo Fisher Scientific).

La línea celular Huh-7 es una línea celular inmortal de células tumorigénicas de tipo epitelial, derivada de hepatocarcinoma, originalmente se tomó de un tumor hepático de un hombre japonés de 57 años. Entre sus características se encuentra el perfil de metabolización de fármacos más cercano a hepatocitos primarios. Se cultivaron en medio esencial mínimo DMEM (Thermo Fisher Scientific) complementado con 10% de suero fetal bovino y glucosa 1 g/L.

Para su correcto crecimiento fue necesario mantener las células en incubadora a 37 °C con atmósfera húmeda 95% de aire y 5% de CO₂, cultivadas en frascos de 75 cm². La ventaja que tienen estos tipos celulares sobre el cultivo primario es eliminar la variabilidad entre las muestras de donantes, la disponibilidad, el costo y la vida relativamente corta que tienen los cultivos primarios.

6.8. Transfección

Los ensayos de transfección se realizaron en ambas líneas celulares, HepG2 y Huh-7. Para cada ensayo se cultivaron 200,000 células por pozo en cajas de 6 pozos. Los ensayos se realizaron por triplicado en todos los casos.

Para validar que el promotor de *c-MYC* está activo se realizaron ensayos por triplicado con las construcciones pGL3-Myc-P1 (Barraza-Reyna, P. 2016), pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2. Para cada reacción se diluyeron 10 μL de lipofectamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en 250 μL de medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y en otro tubo estéril se colocó 1 μg de DNA plasmídico de vector prueba, 100 ng del vector para normalizar la eficiencia de transfección pRL-CMV y 250 μL de Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se mezcló la dilución de lipofectamina con la dilución de DNA y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Los plásmidos pGL3 Control Vector y pGL3 Basic Vector se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente.

Durante los 20 min de incubación se realizó cambio de medio de las placas de cultivo celular, primero se realizó un lavado con 1 mL de PBS 1 \times (Passive Lysis Buffer) y se colocaron 2 mL de Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) en cada pozo. Pasado el tiempo de incubación se agregó la mezcla de complejos DNA-lípidos por goteo a las células, y 5 h después de la transfección se cambió a medio con suero.

6.9. Tratamiento farmacológico

Para analizar el efecto de los fármacos en la actividad de los promotores del gen *c-MYC* se realizó la transfección con los vectores prueba, y los vectores control, 5 h post transfección se realizó el cambio a medio de cultivo DMEM (Thermo Fisher Scientific) con DMSO 0.1% para los ensayos control, para los tratamientos se colocó medio de cultivo DMEM con DMSO 0.1% y fármaco isotretinoína a concentración 10 μM o fármaco talidomida 10 $\mu\text{g/mL}$ y se mantuvo en incubación a 37°C, 5% de CO₂ durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente también se evaluó el efecto de la concentración de isotretinoína en las células HepG2 a 1 μM , 5 μM , 10 μM y 20 μM . Todos los ensayos se realizaron por triplicado, de manera independiente para cada periodo.

6.10. Ensayo de actividad luciferasa

La actividad de los promotores P1, P2 y la fusión P1-P2 de *c-MYC*, se analizó evaluando la actividad del gen reportero luciferasa. Se utilizó el sistema Dual-Luciferase (Promega, Wisconsin, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Primero se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 1 mL PBS 1×, se agregaron 500 µL de PLB 1× (Passive Lysis Buffer) a cada pozo, se mantuvo en agitación durante 15 min y se recuperó en tubo estéril. Se transfirieron 20 µL de cada lisado en placa de 96 pozos y la lectura de la actividad luciferasa se realizó utilizando un luminómetro GloMax® 96 (Promega, Wisconsin, USA), se configuró el inyector 1 para dispensar 100 µL de LAR II y medir la actividad luciferasa de luciérnaga, y el inyector 2 para dispensar 100 µL de Reactivo Stop & Glo® para medir la actividad luciferasa de Renilla.

Como control negativo de la actividad luciferasa se tomaron a células no transfectadas y se normalizó la actividad luciferasa de *Photinus pyralis* con la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis*.

6.11. Análisis estadístico

Los resultados del ensayo de actividad luciferasa se analizaron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney utilizando el software SPSS v.20. Aquellos valores donde la $P < 0.05$ fueron considerados como significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2

Los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 fueron caracterizados por medio de digestión con enzimas de restricción. El vector pGL3-Myc-P2 fue digerido con las enzimas *XhoI* y *XbaI*, se obtuvieron productos de 3108 y 1800 pb, mientras que para el vector pGL3-Myc-P1-P2 digerido con la enzima *XhoI*, los productos obtenidos fueron de 4908 y 2413 pb (Figura 8). El patrón de bandas de cada vector coincidió con el análisis *in silico* realizado previamente.

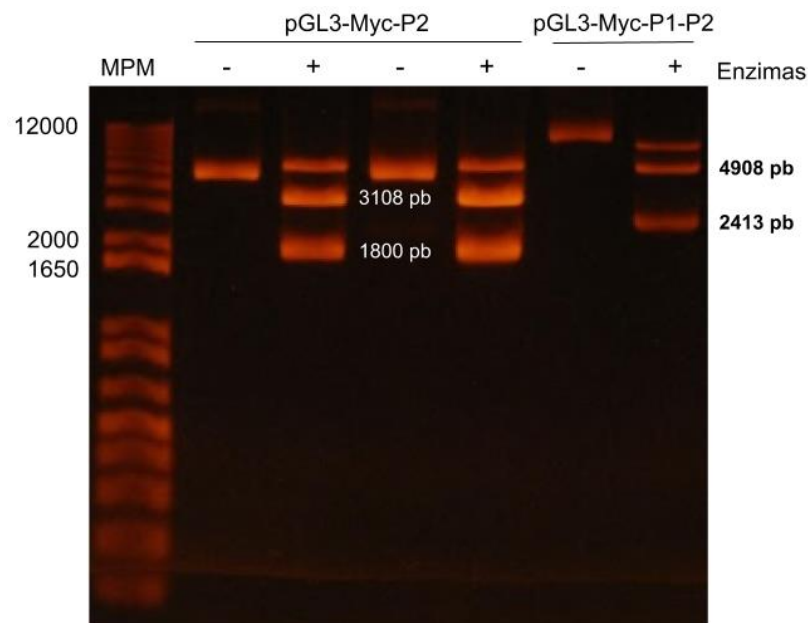


Figura 8. Digestión enzimática de los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2. El vector pGL3-Myc-P2 fue digerido con la enzima *XbaI* y *XhoI* (New England Biolabs), mientras que pGL3-Myc-P1-P2 con *XhoI* (New England Biolabs). Gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red (Biotium). MPM, corresponde al marcador de peso molecular (1Kb Plus, Invitrogen). Símbolo negativo, corresponde al control negativo (reacción sin enzima). Símbolo positivo, corresponde a la digestión enzimática.

Una vez verificado el peso molecular de los fragmentos obtenidos de la digestión con las enzimas de restricción, el DNA plasmídico se purificó utilizando el kit QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, DEU) siguiendo las instrucciones del proveedor y se visualizó su integridad del DNA en gel de agarosa. Las construcciones purificadas que contienen región promotora de *c-MYC*, pGL3-Myc-

P1, pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 se visualizan en los carriles 1, 2 y 3. También se purificaron los vectores pGL3 Basic Vector, que corresponde al control sin promotor (carril 4), pGL3 Control Vector, que contiene el promotor fuerte SV40 (carril 5) y phRL-CMV que se utiliza para normalizar la transfección y contiene al promotor fuerte de citomegalovirus (carril 6) (Figura 9).

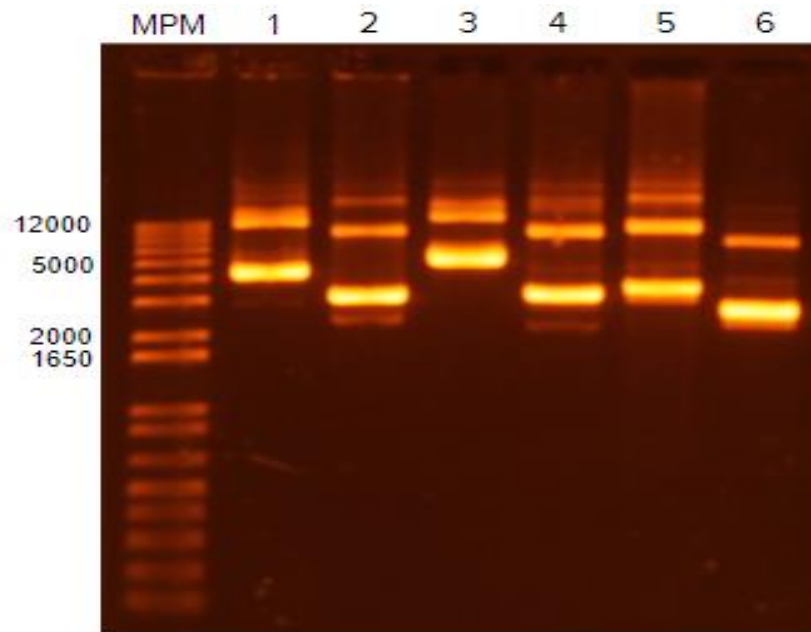


Figura 9. Visualización de vectores pGL3 con los promotores de *c-MYC* purificados. 1) pGL3-Myc-P1, 2) pGL3-Myc-P2, 3) pGL3-Myc-P1-P2, 4) pGL3 Basic Vector, 5) pGL3 Control Vector y 6) phRL-CMV. Gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red (Biotium). MPM, corresponde al marcador de peso molecular (1Kb Plus, Invitrogen).

La integridad de la secuencia de la región promotora de las construcciones pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 se verificó por secuenciación, para pGL3-Myc-P2 se utilizó el primer Rvprimer3 (*forward*) y para pGL3-Myc-P1-P2 se utilizó Glprimer2 (*reverse*), en la figura 10 en la parte superior se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida (azul) con la secuencia de referencia NG_007161.2 (amarillo), en la parte inferior se muestra la parte inicial y final del electroferograma obtenido para la región promotora de ambos vectores. La secuencia obtenida presentó una similitud del 100% con la secuencia de referencia NG_007161.2.

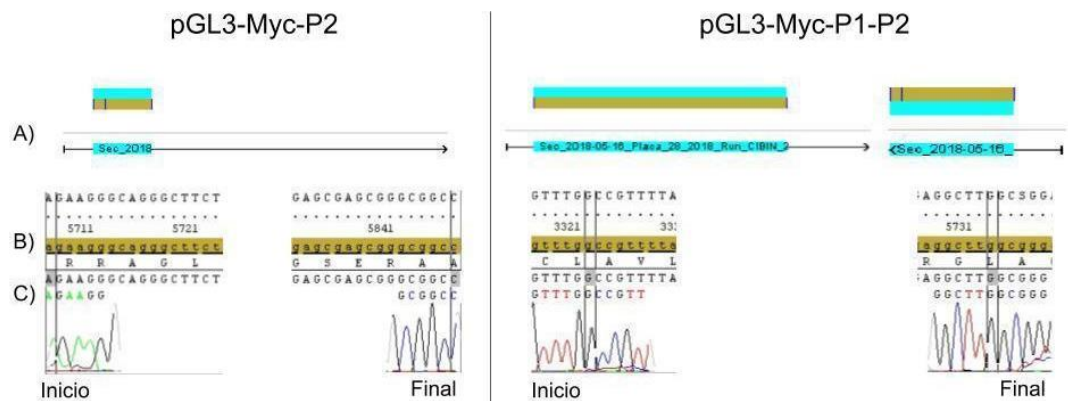


Figura 10. Caracterización de los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 por secuenciación. Región inicial y final del electroferograma obtenido de la secuenciación de la región promotora de los vectores pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2. A) Esquema que ilustra el ensamblaje de la secuencia obtenida (azul) con la secuencia de referencia (amarillo). B) Secuencia de referencia NG_007161.2. C) Secuencia obtenida. En la parte superior se indica el vector al que corresponde el electroferograma. Las flechas representan la dirección del primer utilizado para la secuenciación, Rvprimer3 (*forward*) y Glprimer2 (*reverse*).

7.2. Actividad de los promotores P1 y P2 de *c-MYC* en células HepG2 y HuH-7

Las células HepG2 y Huh-7 fueron transfectadas con las construcciones pGL3-Myc-P1, pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2, conteniendo al promotor P1, P2 y P1-P2 del gen *c-MYC*, respectivamente. Paralelamente se incluyeron en la transfección los controles pGL3 Control Vector, el cual contiene al promotor fuerte de citomegalovirus, y pGL3 Basic Vector que no tiene región promotora. Después de 24 h de la transfección, las células fueron lisadas y se midió la actividad de luciferasa. En las figuras 11 y 12 se observan los resultados de la actividad promotora de *c-MYC* en células HepG2 y Huh-7 respectivamente, se incluyeron las construcciones pGL3-Myc-P1, pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 y en ambos casos se utilizó pGL3 Basic Vector como referencia a 1. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba U de Mann-Whitney, mostrando que hay diferencia significativa en la expresión del gen reportero entre las células transfectadas con las construcciones pGL3-Myc-P1, pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2 con respecto al control pGL3 Basic Vector (Figura 11 y 12). La construcción con mayor actividad promotora de *c-MYC* en las células HepG2 fue pGL3-Myc-P2, mientras que en las células Huh-7 fue pGL3-Myc-P1-P2. El control pGL3 Control Vector mostró una actividad superior a las 400

unidades relativas de luminiscencia en las células HepG2 y superiores a 3,000 en Huh-7 (Figura 11 y 12).

En las células HepG2 la inducción de la actividad luciferasa por parte del promotor P2 fue 14.10 veces mayor que la actividad del promotor P1 y 1.43 veces mayor que la actividad del promotor P1-P2 (Figura 11). En células Huh-7 la inducción de la actividad luciferasa del promotor P2 fue 5.03 veces mayor que la actividad de P1, y 10 veces mayor la de P1-P2 con respecto a P1 (Figura 12).

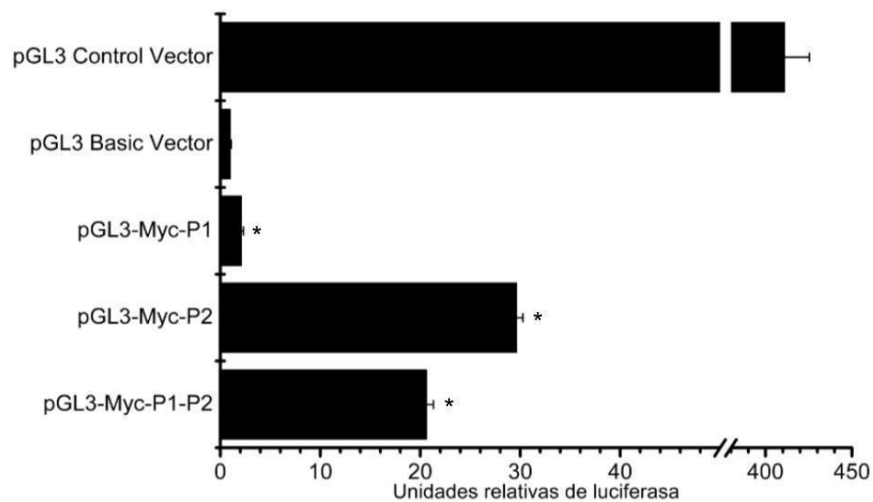


Figura 11. Actividad de los promotores P1 y P2 de *c-MYC* humano en células HepG2. Las células fueron transfectadas con las construcciones pGL3-Myc-P1, pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2. Las unidades relativas de luciferasa son valores arbitrarios y fueron establecidos en relación a la actividad luciferasa de la construcción pGL3 Basic Vector (Valor de 1). pGL3 Control Vector corresponde al control positivo. * $P < 0.05$.

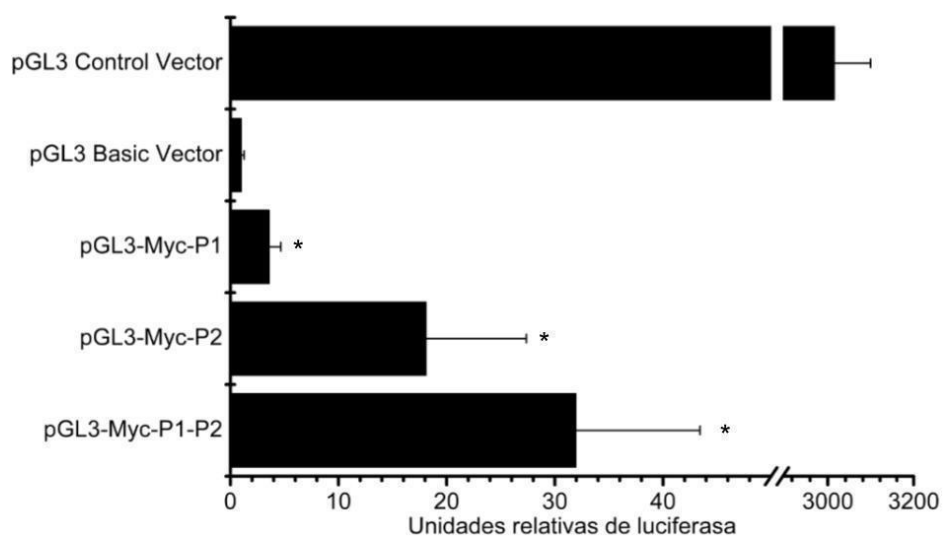


Figura 12. Actividad de los promotores P1 y P2 de *c-MYC* humano en células Huh-7. Las células fueron transfectadas con las construcciones pGL3-Myc-P1, pGL3-Myc-P2 y pGL3-Myc-P1-P2.(cont.)

(cont.) Las unidades relativas de luciferasa son valores arbitrarios y fueron establecidos en relación a la actividad luciferasa de la construcción pGL3 Basic Vector (Valor de 1). pGL3 Control Vector corresponde al control positivo. * $P < 0.05$.

Después de validar que el promotor de *c-MYC* se encuentra activo en ambas líneas celulares se realizó el ensayo de transfección en células HepG2 en presencia de los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida. Como resultado se observó que en células HepG2 hay una disminución significativa del 11.3% en la actividad del promotor P2 y del 7%, en la actividad del promotor P1-P2 por efecto del fármaco isotretinoína, mientras que el fármaco talidomida no mostró efecto significativo (Figuras 13). El efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida también se evaluó en la línea celular Huh-7. Los resultados mostraron que ninguno de los fármacos mostró un cambio significativo en la actividad de los promotores P2 y P1-P2 con respecto al tratamiento control (Figura 14).

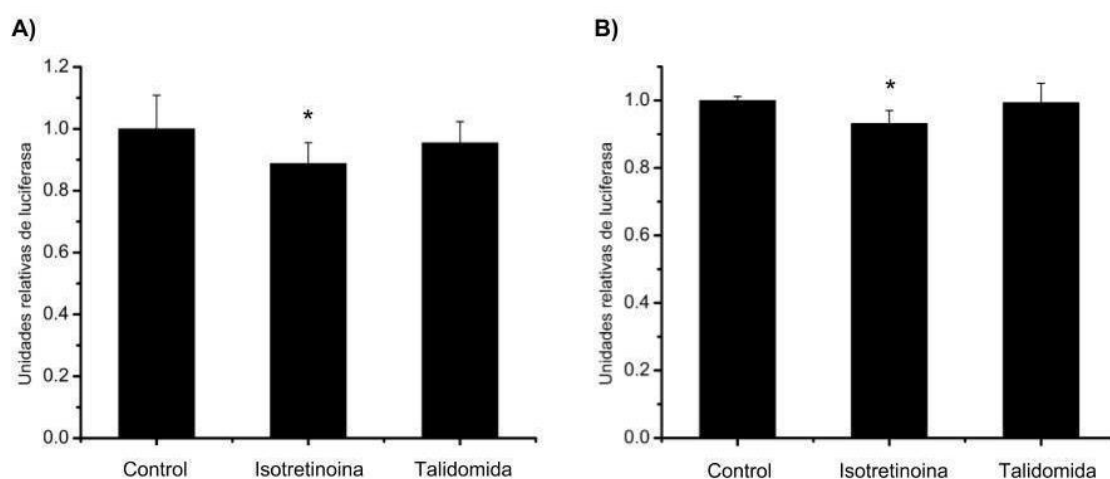


Figura 13. Actividad de los promotores P1 y P2 de *c-MYC* humano en células HepG2 en respuesta a fármacos. A) Células transfectadas con pGL3-Myc-P2, B) Células transfectadas con pGL3-Myc-P1-P2. El control corresponde a células cultivadas en medio con DMSO 0.1%; Fármacos: Isotretinoína 10 μ M, DMSO 0.1%; Talidomida 10 μ g/mL, DMSO 0.1%. Las unidades relativas de luciferasa son valores arbitrarios establecidos en relación a la actividad luciferasa de las construcciones correspondientes con el tratamiento control (Valor de 1). * $P < 0.05$.

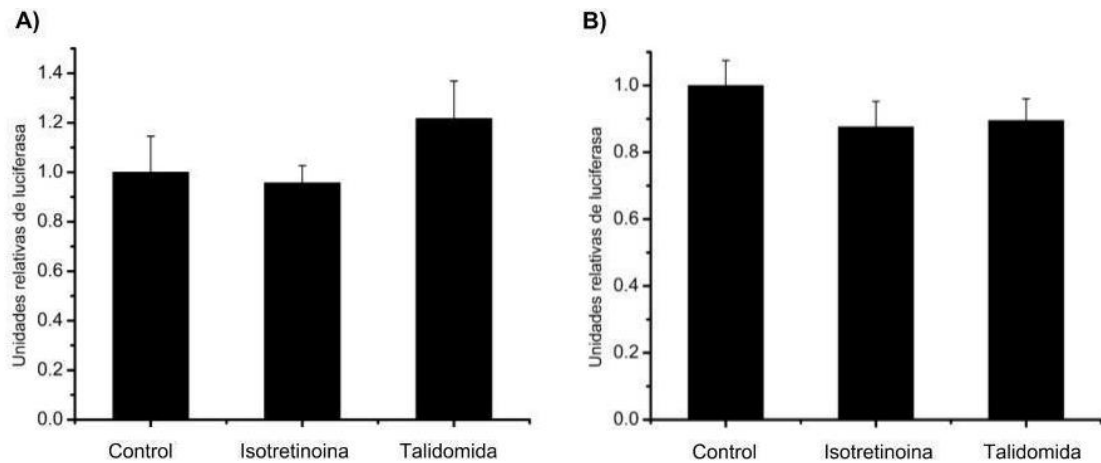


Figura 14. Actividad de los promotores P1 y P2 de *c-MYC* humano en células Huh-7 en respuesta a fármacos. A) Células transfectadas con pGL3-Myc-P2, B) Células transfectadas con pGL3-Myc-P1-P2. El control corresponde a células cultivadas en medio con DMSO 0.1%; Fármacos: Isotretinoína 10 μ M, DMSO 0.1%; Talidomida 10 μ g/mL, DMSO 0.1%. Las unidades relativas de luciferasa son valores arbitrarios establecidos en relación a la actividad luciferasa de las construcciones correspondientes con el tratamiento control (Valor de 1).

Posteriormente, en la línea celular HepG2 se transfectó al vector pGL3-Myc-P2, por ser la construcción que mostró mayor actividad y se aplicó el tratamiento con el fármaco isotretinoína durante 24, 48 y 72 h. Los ensayos se realizaron por triplicado de manera independiente para cada periodo, obteniendo una disminución significativa del 29.8%, 24.2% y 17.4%, respectivamente, comparado con el tratamiento control (Figura 15).

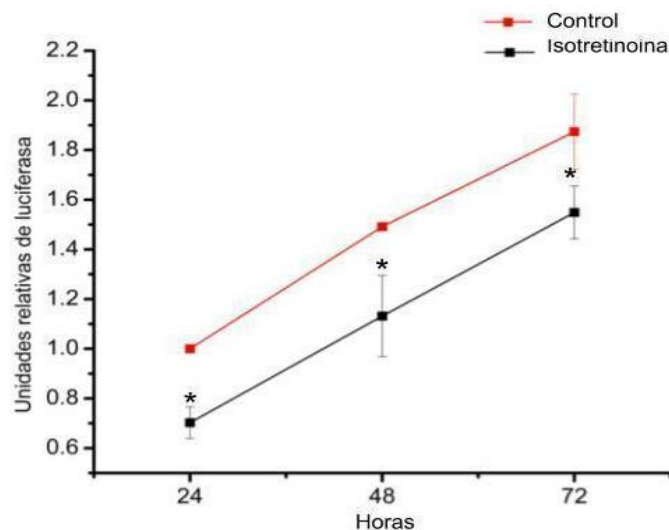


Figura 15. Actividad del promotor P2 de *c-MYC* humano en células HepG2 en respuesta a fármacos durante 24, 48 y 72 h. Células transfectadas con el vector pGL3-Myc-P2. Control corresponde a medio con DMSO 0.1%. Isotretinoína utilizada al 10 μ M; control fueron células expuestas a DMSO 0.1% Las unidades relativas de luciferasa son valores arbitrarios (cont.)

(cont.) establecidos en relación a la actividad luciferasa de la construcción pGL3-Myc-P2 con el tratamiento control a las 24 h (Valor de 1). * $P < 0.05$.

Por último se evaluó el efecto del fármaco isotretinoína en distintas concentraciones, 1, 5, 10 y 20 μM durante 24 h en las células HepG2 transfectadas con el vector prueba pGL3-Myc-P2. No se observó diferencia significativa con los tratamientos de isotretinoína a las concentraciones 1 y 20 μM , mientras que la concentración de 5 μM disminuyó significativamente la actividad del promotor P2 un 17.71% y a la concentración de 10 μM disminuyó significativamente un 20.3% comparado con el tratamiento control (Figura 16).

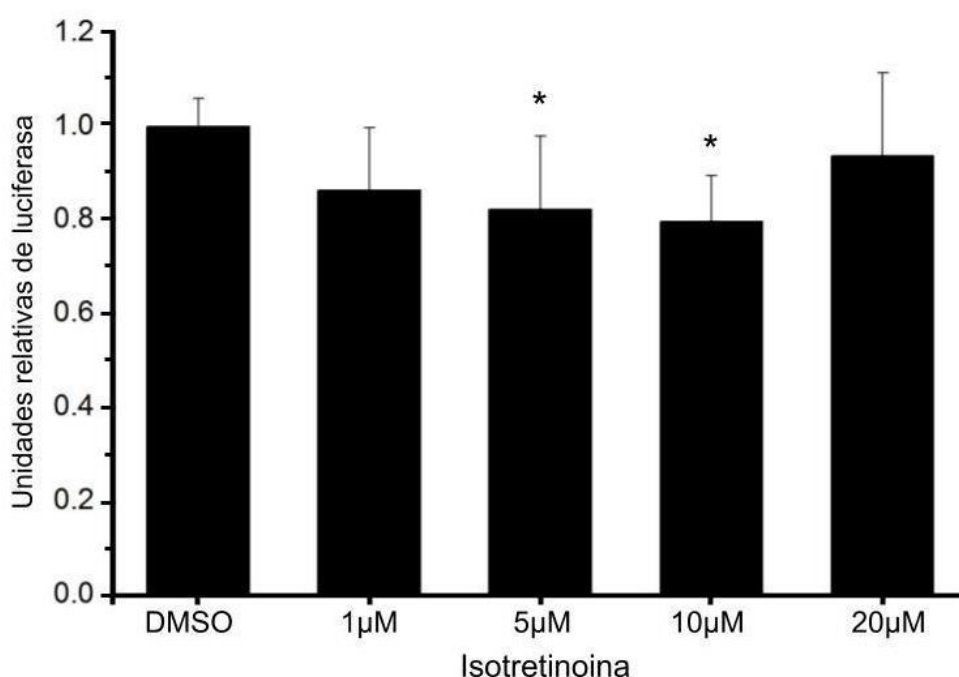


Figura 16. Actividad del promotor P2 de *c-MYC* humano en células HepG2 en respuesta al fármaco isotretinoína a distintas concentraciones. Células transfectadas con el vector pGL3-Myc-P2. El control corresponde a células expuestas a DMSO 0.1%. Concentraciones de isotretinoína: 1 μM , 5 μM , 10 μM y 20 μM . Todos los tratamientos se aplicaron durante 24 h. Las unidades relativas de luciferasa son valores arbitrarios establecidos en relación a la actividad luciferasa de la construcción pGL3-Myc-P2 con el tratamiento control (Valor de 1). * $P < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

En el ensayo de actividad luciferasa en células HepG2 y Huh7, el promotor P1 tuvo la menor actividad, lo que coincide con los antecedentes que indican que el promotor P1 es el encargado de generar de 10-25% de transcrito, mientras que P2 genera 75-90% (Wierstra y Alves 2008). La actividad mayor del promotor P2 puede ser explicada por los elementos reguladores presentes en su secuencia, como la caja TATA que se ha descrito como óptima (Bareket *et al.* 2000; Wierstra y Alves 2008) y la presencia de dos elementos Inr (Facchini *et al.* 1997; Marcu *et al.* 1997). Anteriormente esta región ya se había identificado como el promotor mínimo (Kaur y Cole 2013). A lo largo del promotor de *c-MYC* se han identificado múltiples sitios de unión de factores de transcripción lo que puede sugerir también que en la región promotora P2 se podrían encontrar más sitios para activación o menos sitios de represión, mientras que en la región promotora P1 contar con más sitios de represión, por lo que al estar separados permite la mayor actividad por parte del promotor P2.

También se evaluó la actividad de los promotores P1 y P2 unidos y se obtuvieron resultados diferentes en cada línea celular, mientras que en las células HepG2 la actividad de P1-P2 fue menor que la del promotor P2 individual, en células Huh-7 la mayor actividad fue por parte de los promotores fusionados P1-P2. Se ha reportado que la proteína MAZ (Proteína de dedo de zinc asociada a MYC) se encuentra expresada de manera diferente en las líneas celulares, mientras que en HepG2 se encuentra sobreexpresada, en células Huh-7 la expresión de MAZ es comparable con la expresión en células normales (Luo *et al.* 2016). La sobreexpresión de esta proteína regula de diferentes maneras la actividad del promotor de *c-MYC* dependiendo del sitio de unión en su secuencia, si se une al sitio ME1a1 (localizado en el promotor P2) activa al promotor P2, pero si se une al sitio ME1a2 (localizado en el promotor P1) lo reprime (Izzo *et al.* 1999; Marcu *et al.* 1997; Wierstra y Alves 2008), por lo que se puede sugerir que la alta actividad del promotor P2 en las células HepG2 puede deberse a la sobreexpresión de MAZ que activa este promotor en las células transfectadas con la construcción pGL2-Myc-P2, pero en las células transfectadas con la construcción pGL3-Myc-P1-P2, al encontrarse el sitio ME1a2 en la secuencia la unión de MAZ a este sitio reprime la actividad de P2. Mientras que en el caso de las células Huh-7 con niveles menores de MAZ, no se observa la misma represión en las células transfectadas con el promotor pGL3-Myc-P1-P2.

A lo largo de la región promotora de *c-MYC* se encuentran múltiples sitios de unión a factores de transcripción, al utilizarse como modelo diferentes líneas celulares, la expresión diferencial de factores de transcripción puede contribuir a la expresión diferente de luciferasa a cargo de los promotores P1 y P2. Como por ejemplo el sitio CT-I2 es esencial para la activación del promotor P2 por parte de Sp1 (Majello *et al.*, 1995). β -catenina y γ -catenina también actúan como activadores a través del sitio de unión TCF-4 localizado en el promotor P1 (He *et al.* 1998). Entre los sitios represores de *c-MYC* se encuentran Ovol1 localizado en el promotor P1 (Nair *et al.* 2006), MBP-1 que se localiza en el promotor P2 e incluye su caja TATA. También los sitios E2F y ME1a2 que se localizan en el promotor P2 pueden reprimir a *c-MYC* a través de la unión de p53 (Wierstra y Alves 2008), y también a través de la unión Mxi1 en el sitio E2F se puede reprimir específicamente la actividad del promotor P2 (Luo *et al.* 2004). Los elementos MIE1, MIE2 y MIE3 localizados en el promotor P2 pueden reprimir la actividad de *c-MYC* a través de 1,25-(OH)₂-D3 y HOXB4 (Pan y Simpson 1999). También hay sitios de unión que actúan activando o reprimiendo la actividad tanto de P1 como P2, como el sitio de unión FBP localizado en el promotor P1 activa ambos promotores por la unión de FUSE (He *et al.* 2000). FOXM1c puede activar también ambos promotores uniéndose directamente en sus cajas TATA (Wierstra y Alves 2006). Otro sitio esencial para la actividad de ambos promotores es NF- κ B a través de κ Ei y κ E3' (Wittekindt *et al.* 2000). Las diferencias del origen de las células implican cambios en la expresión de estos genes que activan o reprimen a los promotores P1 y P2, y pueden ser el motivo del diferente nivel de expresión de los promotores en cada línea celular. También se pudo observar diferencia en la actividad del promotor control CMV, mientras que en las células HepG2 la actividad fue de aproximadamente 400 unidades relativas de luciferasa, en células Huh-7 la actividad llegó a 3000 unidades aproximadamente.

Después de confirmar que el promotor de *c-MYC* se encuentra activo en ambas líneas celulares y que los promotores P2 y P1-P2 son los más activos, se decidió trabajar con la actividad del promotor P2 por efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida. A diferencia de los resultados obtenidos anteriormente (Aguirre-Vázquez 2017, datos no publicados) donde se evaluó la expresión de *c-MYC* por efecto de estos fármacos y se obtuvo una alta diferencia significativa en la represión de este gen, cuando se evaluó el efecto de estos fármacos en la actividad promotora de *c-MYC* si se obtuvo diferencia significativa por efecto del fármaco isotretinoína sobre

la actividad del promotor P2 y P1-P2 en células HepG2, pero no se observó diferencia por efecto del fármaco talidomida en la actividad de los promotores en ambas líneas celulares. Lo anterior podría indicar que los fármacos actúan principalmente alterando la estabilidad del mRNA y en menor medida afectan la actividad promotora de *c-MYC*. La degradación del mRNA puede ser regulada por varios mecanismos entre ellos proteínas de unión a mRNA o endo- y exoribonucleasa degradativas; además, entre los mecanismos que podrían estar involucrados está la regulación positiva de miR-103 que se ha demostrado que es inducida por el fármaco isotretinoína (Annibali *et al.* 2012) y está involucrado en la inhibición de la proliferación celular y disminución de la expresión de *c-MYC* (Kfir-Erenfeld *et al.* 2017). Otro efecto que podrían tener los fármacos isotretinoína y talidomida es que disminuyen la expresión de *c-MYC* alterando la estabilidad del mRNA al afectar la expresión de CRD-BP (coding region instability determinant-binding protein), esta proteína está encargada de proteger el mRNA de *c-MYC* en su región determinante de inestabilidad (Lemm y Ross 2002), su sobreexpresión está asociada al desarrollo de los tipos más agresivos de cáncer, en el desarrollo embrionario normal y se encuentra ausente en tejidos adultos sanos (Noubissi *et al.* 2010).

En cuanto a la diferencia de actividad de los fármacos en cada línea celular, se observó que uno de los fármacos, isotretinoína, si disminuyó significativamente la actividad de los promotores P2 y P1-P2 en la línea celular HepG2, mientras que en las células Huh-7 no se observó diferencia significativa en la actividad de promotora de *c-MYC* por efecto de ninguno de los fármacos probados. Una de las posibles causas por las que las células HepG2 fueron más sensibles al tratamiento en comparación con las células Huh-7 puede ser por el estado de p53, las células HepG2 contienen p53 *wild-type* mientras que Huh-7, p53 mutante (Müller *et al.* 1997). Estudios anteriores en células Baf-3 han demostrado que la represión de *c-MYC* está mediada de una manera dependiente de p53, aunque la región promotora de *c-MYC* tiene sitios de unión para p53, la represión de *c-MYC* no está mediada por este mecanismo, si no por mecanismos que involucran desacetilación de las histonas (Ho *et al.* 2005).

Aunque en reportes anteriores el uso de inhibidores de histona deacetilasa, tricostatina A, anularon la capacidad de p53 para reprimir la transcripción de *c-MYC* en células Baf-3 (Ho *et al.* 2005), se sugiere que en el caso de las células HepG2 y

utilizando el inhibidor de histonas deacetilasa isotretinoína, un activador de la transcripción, se estimule la actividad de p53 que a su vez reprima la actividad de los promotores de *c-MYC*, esto podría dar una razón de la mayor sensibilidad de estas células al tratamiento con isotretinoína, a diferencia de las células Huh-7 que tienen p53 mutado.

Anteriormente ya se había demostrado que el tratamiento de células HepG2, Huh-7 y Hep3B (negativas para p53) con bleomicina, un fármaco utilizado en el tratamiento contra el cáncer, no incrementaba la expresión de CD95 en las líneas con p53 no funcional, y sólo siendo sensibles a apoptosis mediada por CD95 las células HepG2 (Müller *et al.* 1997) por lo que hay que considerar la expresión de p53, dependiendo del tipo celular para intentar prevenir problemas de quimioresistencia y tener una idea del éxito del tratamiento, de hecho, mutaciones en p53 en muchas enfermedades se asocian a diagnóstico pobre. En nuestros resultados el tratamiento con isotretinoína sólo fue efectivo disminuyendo la actividad de los promotores P2 y P1-P2 en células con p53 funcional. Otra diferencia entre las líneas celulares que podría estar afectando el efecto de los tratamientos sobre la actividad de *c-MYC* es el hecho de que la vía Wnt/ β -catenina se encuentra más activa en células HepG2 en comparación con Huh-7 (Wei *et al.* 2011). Por otra parte, el efecto de la talidomida tanto en células HepG2 y Huh-7 fue similar, no se observó efecto significativo en la actividad de los promotores de *c-MYC*. A la fecha no se ha descrito el efecto que tiene la talidomida en el promotor de *c-MYC* en células hepáticas, el antecedente más reportado de su mecanismo de acción y su relación con *c-MYC* es en células de mieloma múltiple. Por lo que de acuerdo a los antecedentes encontrados, el efecto de la talidomida o sus análogos sobre este gen es de acción indirecta a través de la unión a CRBN, modula el reconocimiento de sus sustratos y evita la auto ubiquitinación y por otra parte aumenta la tasa de degradación de IKZF1/3 que a su vez disminuyen la expresión de *c-MYC* (Licht *et al.* 2014), debido a que no se observó una disminución en la actividad promotora de *c-MYC* se sugiere que en células HepG2 y Huh-7 ocurran otros mecanismos a través de los cuales el principal efecto sea alterando la estabilidad del mRNA, como se observó en los resultados de Aguirre-Vazquez, 2017 (datos no publicados). Otro mecanismo de la talidomida y sus análogos es que promueve la degradación de p53 por inhibición de la auto ubiquitinación de MDM2 (*mouse double minute 2 protein*), como se mencionó anteriormente, se ha reportado que p53 induce la inhibición de *c-MYC*, por lo que este podría ser uno de los motivos

por los que no se observa que la talidomida tenga efecto en células HepG2 y Huh-7 (Wei *et al.* 2013). Después de observar que el fármaco isotretinoína fue el más efectivo disminuyendo la actividad del promotor *c-MYC* se evaluó el efecto de este fármaco en distintos periodos de exposición, 24, 48 y 72 h en células HepG2, obteniendo como resultado una disminución significativa del 29.8%, 24.2% y 17.4% respectivamente. El efecto que tiene este fármaco sobre la expresión de *c-MYC* se ha descrito como un proceso rápido, en otras líneas celulares como HL-60 el proceso comienza en las primeras 3 h de exposición, en U-937 la disminución de *c-MYC* se observa dentro de las primeras 12 h y en THP-1 en la hora 1 (Dimberg y Öberg 2003). No hay antecedentes del efecto de este fármaco a través de tiempo en células hepáticas, pero en otras líneas celulares se ha observado que eventos relacionados con apoptosis y proliferación son evidentes alrededor de los 7-9 días (Nelson *et al.* 2006), por lo que sería conveniente realizar otros ensayos que permitan ver el efecto del fármaco sobre *c-MYC* después de periodos más largos de exposición. Respecto al efecto de las distintas dosis analizadas se observó que la concentración de isotretinoína más efectiva para disminuir la actividad del promotor P2 de *c-MYC* fue 10 μ M, hasta ahora no hay reportes que indiquen la relación de concentración de isotretinoína con la actividad promotora de *c-MYC*, pero se eligió la concentración 10 μ M por encontrarse en el rango de concentraciones farmacológicas alcanzables (Lawrence *et al.* 2001; Marill *et al.* 2002). Además, esta misma dosis se ha encontrado efectiva cuando se utiliza en otro ácido retinoico, la peretinoína, al inhibir la replicación del VHB, mientras que concentraciones más altas también inhiben su replicación, pero inducen citotoxicidad (Murai *et al.* 2018). Por otra parte, la concentración más alta que utilizamos de 20 μ M aumentó la actividad del promotor P2 de *c-MYC* a niveles similares al tratamiento de isotretinoína a la concentración 1 μ M, no hay una explicación precisa de este fenómeno pero en estudios realizados por Murai y cols en 2018, en los que evalúan varios retinoides, entre ellos 13-cis-ácido retinoico, all-trans-ácido retinoico y 9-cis-ácido retinoico, también se observa que no en todos los ensayos hay una relación directa de concentración de fármaco, y viabilidad celular o replicación de virus, que es lo que en ese caso se evaluó. Para determinar si el aumento de la actividad del promotor P2 de *c-MYC* es dependiente de las dosis es necesario realizar ensayos posteriores en los que se exponga a las células a concentraciones superiores a 20 μ M.

Las variaciones de actividad entre ensayos se deben a que las señales luminiscentes se ven afectadas por las condiciones del ensayo, como la temperatura, el pasaje celular, y el medio de cultivo, los resultados obtenidos se deben comparar solo entre muestras medidas al mismo tiempo según el protocolo, *Dual-Glo® Luciferase Assay System Instructions for use of Products E2920, E2940 and E2980*.

Con estos resultados finales se puede concluir que el fármaco isotretinoína disminuyó significativamente la actividad de los promotores P1 y P2 del gen *c-MYC* en la línea celular HepG2 por lo que se tiene como perspectiva evaluar el efecto de este fármaco en la expresión de los genes blanco de *c-MYC*, así como analizar la actividad de *c-MYC* en respuesta al tratamiento con otras moléculas modificadoras de la cromatina.

9. CONCLUSIONES

- Los promotores P1 y P2 se encuentran activos en las líneas celulares HepG2 y Huh7.
- El promotor P2 es el más activo en la línea celular HepG2 comparado con el promotor P1 y P1-P2.
- El promotor P1-P2 presentó mayor actividad en la línea Huh-7 comparado con el promotor P1 y P2.
- La actividad del promotor P2 disminuye cuando se encuentra unido al promotor P1 en la línea celular HepG2.
- La actividad del promotor P2 aumenta cuando se encuentra unido al promotor P1 en la línea celular Huh-7.
- El fármaco talidomida no presentó efecto significativo ($P > 0.05$) en la actividad de los promotores P2 y P1-P2 en ambas líneas celulares.
- El fármaco isotretinoína reprimió significativamente ($P < 0.05$) 11.3% la actividad del promotor P2 y 7% la actividad del promotor P1-P2 del gen *c-MYC* en la línea celular HepG2.
- El fármaco isotretinoína reprimió significativamente ($P < 0.05$) el promotor P2 a 24, 48 y 72 h un 29.8%, 24.2% y 17.4%, respectivamente, comparado con el tratamiento control.
- El fármaco isotretinoína tuvo efecto significativo ($P < 0.05$) a la concentración 5 μ M disminuyendo la actividad del promotor P2 un 17.71% y a la concentración 10 μ M disminuyendo su actividad 20.3% en las células HepG2.
- Las concentraciones 1 μ M y 20 μ M de isotretinoína no tuvieron efecto significativo ($P > 0.05$) en la actividad del promotor P2 en las células HepG2.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión de los genes blanco de *c-MYC* por efecto del fármaco isotretinoína.
- Utilizar el sistema pGL3-Myc-P2 para analizar la actividad de *c-MYC* en respuesta a otras moléculas con actividad remodeladora de cromatina.

11. BIBLIOGRAFÍA

Albert, T., Wells, J., Funk, J. O., Pullner, A., Raschke, E. E., Stelzer, G., & Eick, D. 2001. The chromatin structure of the dual c-myc promoter P1/P2 is regulated by separate elements. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20482-20490.

Annibali, D., Gioia, U., Savino, M., Laneve, P., Caffarelli, E., & Nasi, S. 2012. A new module in neural differentiation control: two microRNAs upregulated by retinoic acid, miR-9 and-103, target the differentiation inhibitor ID2. *PloS one*, 7(7), e40269.

Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H., & Tajima, S. (2001). Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic acids research*, 29(17), 3506-3512.

Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J*. 2000. 76:4–11.

Bardales, J. A., Wieser, E., Kawaji, H., Murakawa, Y., & Darzacq, X. 2018. Selective activation of alternative MYC core promoters by Wnt-responsive enhancers. *Genes*, 9(6), 270.

Bareket S., A., Cohen, I., & Haran, T. E. 2000. Signals for TBP/TATA box recognition 1. *Journal of molecular biology*, 299(4), 965-977.

Barr, L. F., Campbell, S. E., Bochner, B. S., & Dang, C. V. 1998. Association of the decreased expression of $\alpha 3\beta 1$ integrin with the altered cell: environmental interactions and enhanced soft agar cloning ability of c-myc-overexpressing small cell lung cancer cells. *Cancer research*, 58(23), 5537-5545.

Barraza Reyna, P.J. 2016 Aislamiento y evaluación de la actividad el promotor P1 del gen c-MYC humano en una línea celular hepática. Tesis de Licenciatura en Biotecnología Genómica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, pp.59.

Bentley, D. L., & Groudine, M. 1986. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature*, 321(6071), 702.

Bernard, O., Cory, S., Gerondakis, S., Webb, E., & Adams, J. M. 1983. Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *The EMBO journal*, 2(12), 2375-2383.

Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., & Weintraub, H. 1993. Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Molecular and cellular biology*, 13(9), 5216-5224.

Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., & Weintraub, H. 1990. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*, 250(4984), 1149-1151.

Blackwood, E. M., & Eisenman, R. N. 1991. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, 251(4998), 1211-1217.

Board, P. A. 2018. Adult Primary Liver Cancer Treatment (PDQ®). In PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US).

Bolden, J. E., Shi, W., Jankowski, K., Kan, C. Y., Cluse, L., Martin, B. P., & Johnstone, R. W. 2013. HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. *Cell death & disease*, 4(2), e519.

Bossone, S. A., Asselin, C., Patel, A. J., & Marcu, K. B. 1992. MAZ, a zinc finger protein, binds to c-MYC and C2 gene sequences regulating transcriptional initiation and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7452-7456.

Bugianesi, E., Leone, N., Vanni, E., Marchesini, G., Brunello, F., Carucci, P., & Rizzetto, M. 2002. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 123(1), 134-140.

Buurman, R., Gürlevik, E., Schäffer, V., Eilers, M., Sandbothe, M., Kreipe, H., & Skawran, B. 2012. Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, 143(3), 811-820.

Casey, S. C., Tong, L., Li, Y., Do, R., Walz, S., Fitzgerald, K. N., & Felsher, D. W. 2016. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science*, 352(6282), 227-231.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., & Mann, M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325(5942), 834-840.

Cole, M. D. 1986. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annual review of genetics*, 20(1), 361-384.

Croce, C. M. 2008. Oncogenes and cancer. *New England journal of medicine*, 358(5), 502-511.

Csepregi, A., Röcken, C., Hoffmann, J., Gu, P., Saliger, S., Müller, O., & Ebert, M. P. 2008. APC promoter methylation and protein expression in hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134(5), 579-589.

Csoka, A. B., & Szyf, M. 2009. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. *Medical hypotheses*, 73(5), 770-780.

Dai, J., Hatzakis, E., Hurley, L. H., & Yang, D. 2010. I-motif structures formed in the human c-MYC promoter are highly dynamic—insights into sequence redundancy and I-motif stability. *PloS One*, 5(7), e11647.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C., & Croce, C. M. 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24), 7824-7827.

Dang, C. V., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., & Li, F. 2006. The c-Myc target gene network. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 16, No. 4, pp. 253-264). Academic Press.

Desjardins E. & Hay, N. 1993. Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters. *Molecular and cellular biology*, 13(9), 5710-5724.

Dhir, M., Lyden, E. R., Smith, L. M., & Are, C. 2012. Comparison of outcomes of transplantation and resection in patients with early hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Hpb*, 14(9), 635-645.

Dimberg, A., & Öberg, F. 2003. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines. *Leukemia & lymphoma*, 44(10), 1641-1650.

El Tayebi, H. M., Hosny, K. A., Esmat, G., Breuhahn, K., & Abdelaziz, A. I. 2012. miR-615-5p is restrictedly expressed in cirrhotic and cancerous liver tissues and its overexpression alleviates the tumorigenic effects in hepatocellular carcinoma. *FEBS letters*, 586(19), 3309-3316.

El Tayebi, H. M., Omar, K., Hegy, S., El Maghrabi, M., El Brolosy, M., Hosny, K. A., & Abdelaziz, A. I. 2013. Repression of miR-17-5p with elevated expression of E2F-1 and c-MYC in non-metastatic hepatocellular carcinoma and enhancement of cell growth upon reversing this expression pattern. *Biochemical and biophysical research communications*, 434(3), 421-427.

Facchini, L. M., Chen, S., Marhin, W. W., Lear, J. N., & Penn, L. Z. 1997. The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Molecular and cellular biology*, 17(1), 100-114.

Facchini, L. M., & Penn, L. Z. 1998. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *The FASEB Journal*, 12(9), 633-651.

Felsher, D. W., & Bishop, J. M. 1999. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Molecular cell*, 4(2), 199-207.

Frye, R., Myers, M., Axelrod, K. C., Ness, E. A., Piekarz, R. L., Bates, S. E., & Booher, S. 2012. Romidepsin: a new drug for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Clinical journal of oncology nursing*, 16(2).

Fujimoto, A., Furuta, M., Totoki, Y., Tsunoda, T., Kato, M., Shiraishi, Y., & Gotoh, K. 2016. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nature genetics*, 48(5), 500.

Geltinger, C., Hortnagel, K., & Polack, A. 1996. TATA Box and Spl Sites Mediate the Activation of c-myc Promoter P1 by Immunoglobulin κ Enhancers. *Gene expression*, 6(2), 113-127.

Glaser, K. B. 2007. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochemical pharmacology*, 74(5), 659-671.

Globocan, 2018. The Global Cancer Observatory. [En línea] Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>

Gowher, H., & Jeltsch, A. (2001). Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpA sites. *Journal of molecular biology*, 309(5), 1201-1208.

Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. B., & Clément, B. 2012. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 44(6), 694.

Guo, J., Parise, R. A., Joseph, E., Egorin, M. J., Lazo, J. S., Prochownik, E. V., & Eisenman, J. L. 2009. Efficacy, pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of the Myc–Max disruptor, 10058-F4 [Z, E]-5-[4-ethylbenzylidene]-2-thioxothiazolidin-4-one, in mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 63(4), 615-625.

Hamel, P. A., Gill, R. M., Phillips, R. A., & Gallie, B. L. 1992. Transcriptional repression of the E2-containing promoters EIIaE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 12(8), 3431-3438.

Hann, S. R., Thompson, C. B., & Eisenman, R. N. 1985. C-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature*, 314(6009), 366.

Ho, J. S., Ma, W., Mao, D. Y., & Benchimol, S. 2005. P53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology*, 25(17), 7423-7431.

Houghton A. R. 2011. Diagnósticos comunes. En Chamberlain: síntomas y signos en la medicina clínica: una introducción al diagnóstico médico (13^a. ed.) (p.134). México: McGraw Hill.

Izzo, M. W., Strachan, G. D., Stubbs, M. C., & Hall, D. J. 1999. Transcriptional repression from the c-myc P2 promoter by the zinc finger protein ZF87/MAZ. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19498-19506.

Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., & Felsher, D.

W. 2002. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science*, 297(5578), 102-104.

Jhunjhunwala, S., Jiang, Z., Stawiski, E. W., Gnad, F., Liu, J., Mayba, O., & Gao, Z. 2014. Diverse modes of genomic alteration in hepatocellular carcinoma. *Genome biology*, 15(8), 436.

Kaposi-Novak, P., Libbrecht, L., Woo, H. G., Lee, Y. H., Sears, N. C., Conner, E. A., & Thorgeirsson, S. S. 2009. Central role of c-Myc during malignant conversion in human hepatocarcinogenesis. *Cancer research*, 69(7), 2775-2782.

Kfir-Erenfeld, S., Haggiag, N., Biton, M., Stepensky, P., Assayag-Asherie, N., & Yefenof, E. 2017. miR-103 inhibits proliferation and sensitizes hemopoietic tumor cells for glucocorticoid-induced apoptosis. *Oncotarget*, 8(1), 472.

Khalaf, A. M., Fuentes, D., Morshid, A. I., Burke, M. R., Kaseb, A. O., Hassan, M., & Elsayes, K. M. 2018. Role of Wnt/ β -catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *Journal of hepatocellular carcinoma*, 5, 61.

Kiessling, A., Sperl, B., Hollis, A., Eick, D., & Berg, T. 2006. Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA binding by small molecules. *Chemistry & biology*, 13(7), 745-751.

Kuriyama, M., Udagawa, A., Yoshimoto, S., Ichinose, M., Sato, K., Yamazaki, K., & Mori, C. (2008). DNA methylation changes during cleft palate formation induced by retinoic acid in mice. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 45(5), 545-551.

Kleine-Kohlbrecher, D., Adhikary, S., & Eilers, M. 2006. Mechanisms of transcriptional repression by Myc. In *The Myc/Max/Mad Transcription Factor Network* (pp. 51-62). Springer, Berlin, Heidelberg.

Lan, F. F., Wang, H., Chen, Y. C., Chan, C. Y., Ng, S. S., Li, K., & Kung, H. F. 2011. Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by

downregulation of c-Myc and upregulation of p16INK4A. *International Journal of Cancer*, 128(2), 319-331.

Lane, A. A., & Chabner, B. A. 2009. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of clinical oncology*, 27(32), 5459-5468.

Lawrence, J. A., Adamson, P. C., Caruso, R., Chow, C., Kleiner, D., Murphy, R. F., & Cowan, K. H. 2001. Phase I clinical trial of alitretinoin and tamoxifen in breast cancer patients: toxicity, pharmacokinetic, and biomarker evaluations. *Journal of clinical oncology*, 19(10), 2754-2763.

Lee, J. S. 2015. The mutational landscape of hepatocellular carcinoma. *Clinical and molecular hepatology*, 21(3), 220.

Lee, S. G., & Rho, H. M. 2000. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene*, 19(3), 468.

Lee, T. C., & Ziff, E. B. 1999. Mxi1 is a repressor of the c-Myc promoter and reverses activation by USF. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 595-606.

Lei, H., Oh, S. P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K. A., Jaenisch, R., & Li, E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*, 122(10), 3195-3205.

Lemm, I., & Ross, J. 2002. Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Molecular and cellular biology*, 22(12), 3959-3969.

Li, Y., & Seto, E. 2016. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), a026831.

Liao, D. J., & Dickson, R. B. 2000. C-Myc in breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 7(3), 143-164.

Licht, J. D., Shortt, J., & Johnstone, R. 2014. From anecdote to targeted therapy: the curious case of thalidomide in multiple myeloma. *Cancer cell*, 25(1), 9-11.

Lin, C. P., Liu, C. R., Lee, C. N., Chan, T. S., & Liu, H. E. 2010. Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, 2(1), 16.

Lin, C. P., Liu, J. D., Chow, J. M., Liu, C. R., & Liu, H. E. 2007. Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Anti-cancer drugs*, 18(2), 161-170.

Lin, F., Ding, R., Zheng, S., Xing, D., Hong, W., Zhou, Z., & Shen, J. 2014. Decrease expression of microRNA-744 promotes cell proliferation by targeting c-Myc in human hepatocellular carcinoma. *Cancer cell international*, 14(1), 58.

Luo, W., Zhu, X., Liu, W., Ren, Y., Bei, C., Qin, L., & Tan, S. 2016. MYC associated zinc finger protein promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, 7(52), 86420.

Majello, B., De, P. L., Suske, G., & Lania, L. 1995. Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene*, 10(9), 1841-1848.

Marcu, K. B., Patel, A. J., & Yang, Y. 1997. Differential regulation of the c-MYC P1 and P2 promoters in the absence of functional tumor suppressors: implications for mechanisms of deregulated MYC transcription. In *C-Myc in B-cell neoplasia* (pp. 47-56). Springer, Berlin, Heidelberg.

Marengo, A., Rosso, C., & Bugianesi, E. 2016. Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis. *Annual review of medicine*, 67, 103-117.

Marhin, W. W., Chen, S., Facchini, L. M., Fornace Jr, A. J., & Penn, L. Z. 1997. Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene*, 14(23), 2825.

Marill, J., Capron, C. C., Idres, N., & Chabot, G. G. 2002. Human cytochrome P450s involved in the metabolism of 9-cis-and 13-cis-retinoic acids. *Biochemical pharmacology*, 63(5), 933-943.

Maucort-Boulch, D., de Martel, C., Franceschi, S., & Plummer, M. 2018. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *International journal of cancer*, 142(12), 2471-2477.

McDermott, J., & Jimeno, A. 2014. Belinostat for the treatment of peripheral T-cell lymphomas. *Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)*, 50(5), 337-345.

Meng, X., Franklin, D. A., Dong, J., & Zhang, Y. 2014. MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 74(24), 7161-7167.

Moberg, K. H., Logan, T. J., Tyndall, W. A., & Hall, D. J. 1992. Three distinct elements within the murine c-myc promoter are required for transcription. *Oncogene*, 7(3), 411-421.

Mohammadian, M., MahdaviFar, N., Mohammadian-Hafshejani, A., & Salehiniya, H. 2018. Liver cancer in the world: epidemiology, incidence, mortality and risk factors. *World Cancer Res J*, 5(2), e1082.

Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., & Galle, P. R. 1997. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *The Journal of clinical investigation*, 99(3), 403-413.

Murai, K., Shirasaki, T., Honda, M., Shimizu, R., Shimakami, T., Nakasho, S., & Kaneko, S. 2018. Peretinoin, an acyclic retinoid, inhibits hepatitis B virus replication by suppressing sphingosine metabolic pathway in vitro. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 108.

Mžik, M., Chmelařová, M., John, S., Laco, J., Slabý, O., Kiss, I., & Někviňová, J. 2016. Aberrant methylation of tumour suppressor genes WT1, GATA5 and PAX5 in hepatocellular carcinoma. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 54(12), 1971-1980.

Nasu, K., Kawano, Y., Tsukamoto, Y., Takano, M., Takai, N., Li, H., & Narahara, H. (2011). Aberrant DNA methylation status of endometriosis: epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 37(7), 683-695.

Nebbioso, A., Carafa, V., Conte, M., Tambaro, F. P., Abbondanza, C., Martens, J., & Garcia-Manero, G. 2017. C-Myc modulation and acetylation is a key HDAC inhibitor target in cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(10), 2542-2555.

Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., & Weisz, A. 2005. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nature medicine*, 11(1), 77.

Nelson, A. M., Gilliland, K. L., Cong, Z., & Thiboutot, D. M. 2006. 13-cis Retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(10), 2178-2189.

Nishikura, K., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G., & Croce, C. M. 1983. Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(15), 4822-4826.

Noh, J. H., Jung, K. H., Kim, J. K., Eun, J. W., Bae, H. J., Xie, H. J., & Nam, S. W. 2011. Aberrant regulation of HDAC2 mediates proliferation of hepatocellular carcinoma cells by deregulating expression of G1/S cell cycle proteins. *PloS one*, 6(11), e28103.

Noubissi, F. K., Nikiforov, M. A., Colburn, N., & Spiegelman, V. S. 2010. Transcriptional regulation of CRD-BP by c-myc: implications for c-myc functions. *Genes & cancer*, 1(10), 1074-1082.

Parbin, S., Kar, S., Shilpi, A., Sengupta, D., Deb, M., Rath, S. K., & Patra, S. K. 2014. Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(1), 11-33.

Patil, M. A., Gütgemann, I., Zhang, J., Ho, C., Cheung, S. T., Ginzinger, D., & Kakar, S. 2005. Array-based comparative genomic hybridization reveals recurrent chromosomal aberrations and Jab1 as a potential target for 8q gain in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 26(12), 2050-2057.

Penn, L. J., Brooks, M. W., Laufer, E. M., & Land, H. 1990. Negative autoregulation of c-myc transcription. *The EMBO journal*, 9(4), 1113-1121.

Posternak, V., & Cole, M. D. 2016. Strategically targeting MYC in cancer. *F1000 Research*, 5.

Pullner, A., Mautner, J., Albert, T., & Eick, D. 1996. Nucleosomal structure of active and inactive c-myc genes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31452-31457.

Rikimaru, T., Taketomi, A., Yamashita, Y. I., Shirabe, K., Hamatsu, T., Shimada, M., & Maehara, Y. 2007. Clinical significance of histone deacetylase 1 expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 72(1-2), 69-74.

Schlaeger, C., Longerich, T., Schiller, C., Bewerunge, P., Mehrabi, A., Toedt, G., & Schirmacher, P. 2008. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 47(2), 511-520.

Shachaf, C. M., Kopelman, A. M., Arvanitis, C., Karlsson, Å., Beer, S., Mandl, S., & Yang, Q. 2004. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*, 431(7012), 1112.

Shah, S. A., Smith, J. K., Li, Y., Ng, S. C., Carroll, J. E., & Tseng, J. F. 2011. Underutilization of therapy for hepatocellular carcinoma in the medicare population. *Cancer*, 117(5), 1019-1026.

Simile, M. M., De Miglio, M. R., Muroi, M. R., Frau, M., Asara, G., Serra, S., & Pascale, R. M. 2004. Down-regulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells. *Carcinogenesis*, 25(3), 333-341.

Stewart, T. A., Bellve, A. R., & Leder, P. 1984. Transcription and promoter usage of the myc gene in normal somatic and spermatogenic cells. *Science*, 226(4675), 707-710.

Strobl, L. J., & Eick, D. 1992. Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *The EMBO Journal*, 11(9), 3307-3314.

Sung, W. K., Zheng, H., Li, S., Chen, R., Liu, X., Li, Y., & Mulawadi, F. H. 2012. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 44(7), 765.

Tao, L., Yang, S., Xie, M., Kramer, P. M., & Pereira, M. A. (2000). Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer letters*, 158(2), 185-193.

Thorgerisson, S. S., & Grisham, J. W. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 31(4), 339.

Tsai, W. C., Kung, P. T., Wang, Y. H., Kuo, W. Y., & Li, Y. H. 2018. Influence of the time interval from diagnosis to treatment on survival for early-stage liver cancer. *PloS one*, 13(6), e0199532.

Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Sasaki, Y., Takahama, M., & Konishi, Y. 1999. Hypomethylation of CpG sites and c-myc gene overexpression in hepatocellular carcinomas, but not hyperplastic nodules, induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Japanese journal of cancer research*, 90(9), 909-913.

Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W. S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., & Marks, P. A. 2005. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 673-678.

Ververis, K., Hiong, A., Karagiannis, T. C., & Licciardi, P. V. 2013. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics: targets & therapy*, 7, 47.

Wahlström, T., & Henriksson, M. A. 2015. Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 563-569.

Wei, S., Chen, X., McGraw, K., Zhang, L., Komrokji, R., Clark, J., & Fortenbery, N. 2013. Lenalidomide promotes p53 degradation by inhibiting MDM2 auto-ubiquitination in myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Oncogene*, 32(9), 1110.

Wei, W., Chua, M. S., Grepper, S., & So, S. K. 2011. Soluble Frizzled-7 receptor inhibits Wnt signaling and sensitizes hepatocellular carcinoma cells towards doxorubicin. *Molecular cancer*, 10(1), 1.

Wierstra, I., & Alves, J. 2008. The c-myc promoter: still mystery and challenge. *Advances in cancer research*, 99, 113-333.

Xie, H. J., Noh, J. H., Kim, J. K., Jung, K. H., Eun, J. W., Bae, H. J., & Nam, S. W. 2012. HDAC1 inactivation induces mitotic defect and caspase-independent autophagic cell death in liver cancer. *PloS one*, 7(4), e34265.

Zahran, M. A., Gamal-Eldeen, A. M., El-Hussieny, E. A., & Agwa, H. S. 2014. Thalidomide dithiocarbamate and dithioate derivatives induce apoptosis through inhibition of histone deacetylases and induction of caspases. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 65-70.

Zhao, Y., Jian, W., Gao, W., Zheng, Y. X., Wang, Y. K., Zhou, Z. Q., & Wang, C. J. 2013. RNAi silencing of c-Myc inhibits cell migration, invasion, and proliferation in HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line: c-Myc silencing in hepatocellular carcinoma cell. *Cancer cell international*, 13(1), 23.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Paulina Janeth Barraza Reyna

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES P1 Y P2 DEL GEN *c-MYC* POR EFECTO DE LOS FÁRMACOS ISOTRETINOINA Y TALIDOMIDA EN DOS LÍNEAS CELULARES HEPÁTICAS

Campo de Estudio: Inmunobiología

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 8 de Junio de 1991, hija de León José Barraza Méndez y Rosa Lina Paulina Reyna Medina.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Licenciatura en Biotecnología Genómica.