



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

**INHIBICIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA SURVIVINA  
EN LÍNEAS DE CÁNCER**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**MAGALI ESPINOSA CASTILLA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA**

Instituto Nacional de Medicina Genómica

**MÉXICO, D.F.**

**ENERO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

---

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	I
<b>ÍNDICE</b>	II
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
Cáncer	1
Apoptosis	1
Vías apoptóticas	2
Proteínas Inhibidoras de Apoptosis	5
Survivina	7
Papel de la survivina en el ciclo celular	9
Isoformas de la survivina	11
Distribución celular de la survivina	14
Isoformas de la survivina y el cáncer	15
Esferoides	17
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>HIPÓTESIS</b>	20
<b>OBJETIVOS</b>	21
General	21
Específicos	21
<b>METODOLOGÍA</b>	22
Líneas celulares	22
Cultivo celular	22
	2

Cultivo de esferoides	22
Procedimiento histológico	23
Inmunocitoquímica	23
TUNEL	24
Construcción de los RNAs de interferencia	24
Transfección y generación de las líneas celulares estables	26
Ensayo de proliferación	26
Ensayo de viabilidad celular	26
Ensayo de clonogenicidad	27
Ciclo celular	27
Extracción de ARN total	27
Síntesis de ADN complementario	28
PCR semicuantitativo	28
PCR en tiempo real	29
Extracción de Proteínas totales	30
Western Blot	31
<b>RESULTADOS</b>	32
Cultivo de esferoides de líneas celulares de cáncer	32
Expresión de las isoformas en cultivo de monocapa y esferoides	35
Localización de las isoformas de la survivina en el esferoide	41
Resistencia multicelular	44
La inhibición de la survivina DeltaEx3 modifica la sensibilidad de los esferoides a la apoptosis	47

Efecto de la inhibición de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en el crecimiento de los esferoides	51
Efecto de la inhibición de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en la clonogenicidad	52
<i>La sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 inhibe la formación del esferoide, el crecimiento celular y la clonogenicidad</i>	53
Efectos de la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en el ciclo celular	55
<b>DISCUSIÓN</b>	57
<b>CONCLUSIONES</b>	63
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	64
<b>ANEXOS</b>	71
Anexo 1. Abreviaturas	71
Anexo 2. RNA de interferencia	73
Anexo 3. Mecanismos de acción de los fármacos utilizados	74
Anexo 5. Artículo	76

## Resumen

---

La survivina es un miembro de la familia de las Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAPs) y tiene un papel esencial en la apoptosis y en la progresión del ciclo celular. Este gen está comúnmente sobreexpresado en cáncer y es un excelente blanco terapéutico. La survivina se expresa en varias isoformas que son generadas por splicing alternativo; la survivina tipo, la survivina DeltaEx3, la survivina 2B, la survivina 3B y la survivina 2alfa. Algunas de estas proteínas presentan actividades antagónicas. En este estudio, analizamos la expresión de algunas de las isoformas de la survivina durante la progresión del cáncer cervicouterino. Para ésto, utilizamos el cultivo de esferoides. Los esferoides son un modelo de estudio del cáncer en donde se crean cúmulos de células tumorales *in vitro*, simulando tumores sólidos. También, analizamos los efectos de la inhibición de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en procesos como proliferación (división celular) y clonogenicidad (capacidad de una célula para formar una colonia). En la expresión de las isoformas en el cultivo de esferoides, encontramos una correlación positiva entre el crecimiento del esferoide y la expresión de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 durante la fase exponencial. Además, demostramos que la Survivina DeltaEx3 inhibe la formación del esferoide tumoral, disminuyendo la proliferación y la sobrevivencia clonogénica. Estos resultados se dirigen hacia un efecto dual y antagónico de esta isoforma de la survivina en el desarrollo del cáncer.

## **Introducción**

---

### **Cáncer**

El cáncer es una enfermedad que comprende una combinación de aberraciones genéticas, metabólicas y de señalización, las cuales afectan la homeostasis normal del crecimiento celular y de la muerte. Muchos eventos oncogénicos promueven el desarrollo del tumor e incrementan la sensibilidad de las células a estímulos de muerte celulares, incluyendo drogas terapéuticas. Como resultado de esto, las células tumorales frecuentemente adquieren la habilidad para evadir la muerte inactivando vías de muerte celular que normalmente funcionan para eliminar las células dañadas.

Entre las capacidades que adquieren las células de cáncer se encuentran: la insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, el potencial para dividirse ilimitadamente, evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis y la habilidad de metástasis e invasión de tejido sano [1].

El daño de la función celular es frecuentemente la razón del desarrollo de la resistencia a quimoterapéuticos encontrados durante el tratamiento. Es por esto necesario entender las vías de muerte celular existentes y los componentes regulados involucrados, con la intención de identificar nuevas estrategias para matar a las células cancerosas.

### **Apoptosis**

La apoptosis juega un papel fisiológico importante durante el desarrollo embriológico y en el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos. La homeostasis se mantiene a través del balance entre los procesos de proliferación y muerte celular. La alteración de este balance está implicada en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes, SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida), desórdenes neurodegenerativos y síndromes mielodisplásicos [2].

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por la pérdida de los contactos celulares con las células vecinas por alteraciones en las moléculas

de adhesión y en las estructuras celulares especializadas. En este tipo de muerte celular se condensa el citoplasma y el núcleo, seguido por una pérdida de la membrana nuclear, fragmentación de la cromatina y posteriormente, la formación de múltiples vesículas rodeadas de membrana plasmática que contienen material nuclear y citoplasmático, a las que se denominan, cuerpos apoptóticos [3].

La desregulación de la apoptosis ha sido implicada en el origen del cáncer por la prolongación anormal de la supervivencia de la célula. Esta desregulación facilita la acumulación de mutaciones transformantes y promueve la resistencia a la respuesta inmunitaria. Las drogas antineoplásicas ejercen su principal efecto mediante la inducción de muerte celular apoptótica [4].

### ***Vías apoptóticas***

Las vías moleculares que conducen a la muerte celular apoptótica están altamente conservadas evolutivamente y son controladas por proteínas que promueven o impiden esta muerte celular. Entre los reguladores positivos de la apoptosis, se encuentra una familia de cisteín-proteasas llamadas caspasas. Las caspasas son proteínas que se activan por proteólisis y unión a múltiples sustratos y son consideradas las ejecutoras centrales de la apoptosis. Entre las proteínas inhibidoras de las apoptosis, se encuentra la familia IAP (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis), e inhiben este proceso mediante la inhibición de las caspasas. Las IAPs son capaces de regular la apoptosis inducida por receptores de muerte (TNFR, Fas) y drogas antineoplásicas [5,6].

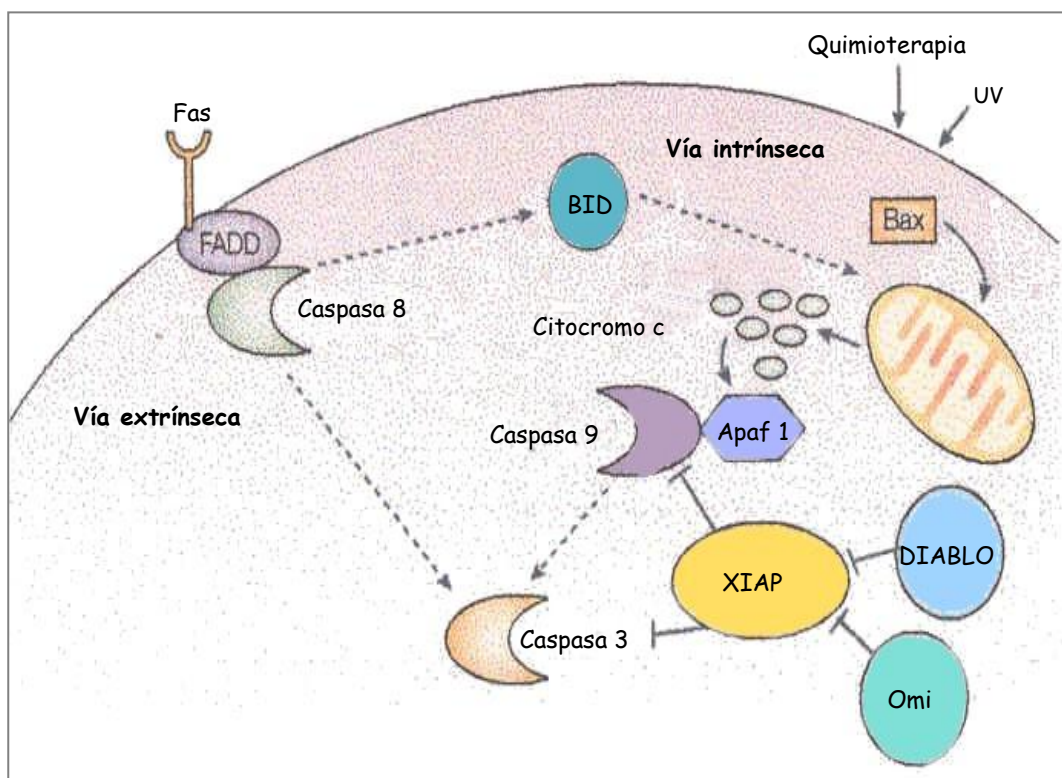
Se han identificado dos vías principales de la apoptosis, las vías extrínseca e intrínseca (Figura1).

La vía extrínseca se lleva a cabo por los receptores membranales de muerte, que forman parte de la familia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), los cuales se caracterizan por poseer un dominio de muerte. Estos receptores una vez que se unen al ligando, trimerizan, conduciendo a la formación del Complejo de Señalización de Inducción de Muerte (DISC), que



puede estar conformado de distintas maneras dependiendo del receptor. En el caso del receptor de muerte Fas, una vez unido al ligando de Fas (FasL), se recluta en el lado citoplasmático del receptor a la proteína FADD a través de sus dominios de muerte (DEDs), los cuales pueden reclutar a la procaspasa 8, provocando su autoactivación [7]. La Caspasa 8 corta y activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 y finalmente, causan la muerte celular [8].

La caspasa 8 también puede activar a un miembro de la familia de Bcl-2, Bid. Esta proteína se dirige a la mitocondria en donde inhibe a Bcl-2 y permite la salida de factores proapoptóticos, amplificando la señal de muerte al activar así la vía intrínseca de la apoptosis [9]. También se ha visto que la caspasa 8 es capaz de activarse por drogas quimioterapéuticas, estrés oxidativo, químicos citotóxicos y radiación ionizante o ultravioleta (UV) [10].



**Figura 1.** Vías de muerte celular. La vía extrínseca mediada por los receptores de muerte y la vía intrínseca, en donde participa activamente la mitocondria. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas [11].

La vía extrínseca puede ser regulada por la familia de proteínas c-FLIP (Proteína inhibidora de FLICE celular), las cuales poseen también un dominio efector de muerte y compiten por la caspasa 8 por su unión al DISC [12,13]. También, esta vía puede ser regulada por la familia de proteínas CARPs (Proteínas RING, asociadas a las caspasas), las cuales regulan negativamente a las caspasas iniciadoras al enviarlas a la degradación por la vía del proteosoma [14].

En la vía intrínseca está involucrada la mitocondria. La mitocondria percibe el estrés celular provocado por la luz UV, agentes quimioterapéuticos y daño al ADN. Esta vía se inicia cuando la membrana mitocondrial externa se permeabiliza por medio de los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2. Esta permeabilización trae como consecuencia la liberación de varias proteínas del espacio intermembranal al citoplasma. Una de estas proteínas es el citocromo c. Una vez en el citoplasma, el citocromo c se une al factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (Apaf 1), el cual cambia su conformación y se oligomeriza para reclutar a la procaspasa 9, formando el apoptosoma y en la presencia de dATP o ATP, activa a la caspasa 9, que a su vez corta y activa varias caspasas efectoras, como la caspasa 3. La caspasa 3 tiene un papel clave en la promoción de la señal de la apoptosis, ya que esta caspasa es responsable de los cortes de la polimerasa poli (ADP-ribosa), PAK2, laminina, gelsolina y fodrina. Estos cortes inhiben la reparación del ADN, promueven la formación de cuerpos apoptóticos, la ruptura de la membrana nuclear y el encogimiento del citoplasma, los cuales son marcadores de la apoptosis [15].

En la mitocondria se encuentran varias proteínas proapoptóticas que se liberan al citoplasma durante la apoptosis. Una de ellas es el Factor de Inducción de la Apoptosis (AIF), que en respuesta a un estímulo apoptótico se transloca al núcleo, donde causa la fragmentación de ADN y en consecuencia la apoptosis, de una manera independiente de las caspasas.

Otras de las proteínas que se liberan, son Smac/DIABLO y la proteasa serina Omi/HtrA2. Estas proteínas facilitan la activación de las caspasas al inactivar a las IAPs [16].

### ***Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis***

Las IAPs fueron descubiertas inicialmente en baculovirus, donde son indispensables para impedir la apoptosis inducida por el virus y por ende, permiten la infección. Actualmente, algunos homólogos celulares de las IAPs han sido identificados en eucariontes [17].

Se caracterizan por poseer de uno a tres dominios BIR (Repetición IAP baculoviral), de aproximadamente 70 aminoácidos. Algunos miembros de esta familia poseen otros dominios, como el RING (Nuevo gen realmente interesante) y/o el CARD (Dominio de reclutamiento para caspasas) [17,18].

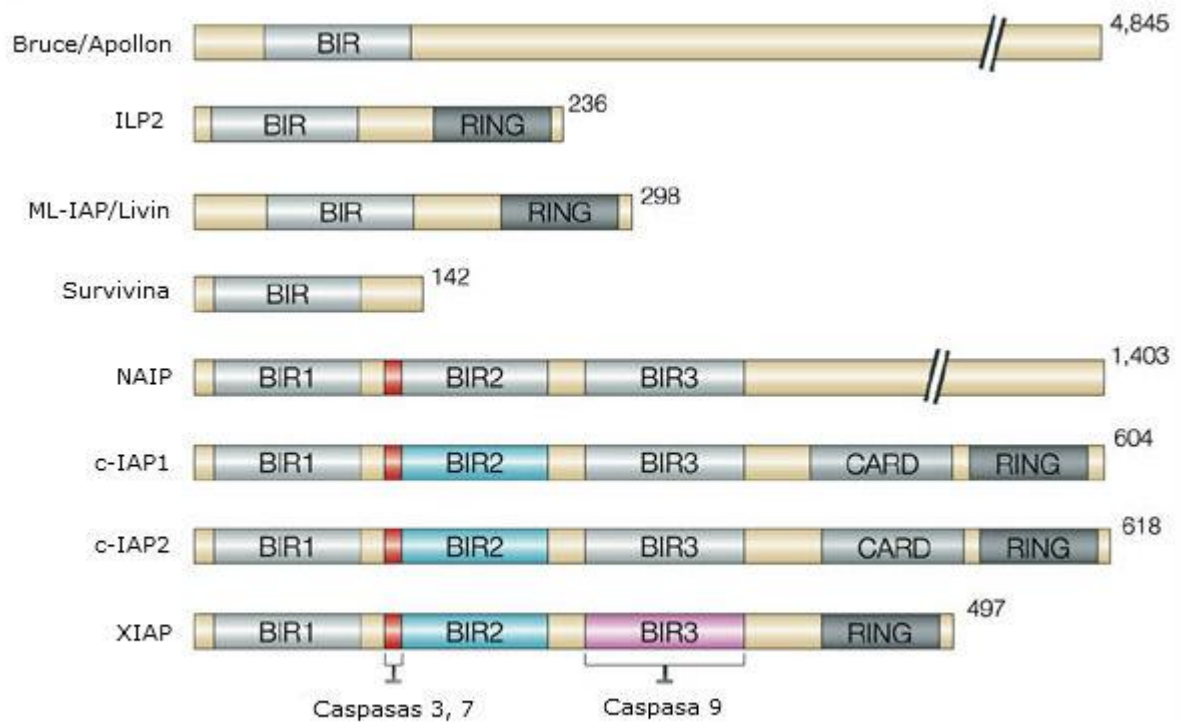
Las IAPs se unen e inhiben a las caspasas por medio de sus dominios BIR, específicamente a la caspasa iniciadora 9 por el tercer dominio BIR (BIR3), y a las caspasas efectoras 3 y 7 por la región intermedia entre los BIR1 y BIR2. Esta interacción bloquea la entrada del sustrato en las caspasas, inhibiendo así su actividad enzimática [19].

Se ha sugerido que el dominio RING también participa en la regulación de las caspasas. Este dominio tiene actividad de ligasa de proteína ubiquitina (E3), y de esta manera puede enviar a degradar a las caspasas. También, este dominio sirve para que la misma IAP pueda autoubiquitinarse y degradarse por la vía del proteosoma [20].

A la fecha se han descrito ocho IAPs en mamíferos (Figura 2), a las cuales además se les ha nombrado BIRC's (Proteínas que contienen BIR) y se les ha numerado por el orden en que fueron descritas [11,18].

c-IAP1/BIRC2 y c-IAP2/BIRC3 son las únicas IAPs que han sido identificadas bioquímicamente, como parte de un complejo de señalización que es reclutado por el dominio citoplásmico de TNF [21]. Estas proteínas reducen la actividad de la caspasa 8, pero no la inhiben directamente; sin embargo, son capaces de inhibir a las caspasas 3 y 7 [11].

XIAP/BIRC4 es la más estudiada y se considera la proteína inhibidora más potente de las caspasas 9, 3 y 7. En base a los estudios de estructura-función de XIAP se ha establecido el modelo de inhibición de las caspasas, que se sugiere es el mismo para las demás IAPs, debido a lo similar de sus estructuras [11].



**Figura 2.** Proteínas Inhibidoras de la apoptosis descritas en humanos. XIAP (IAP unida a X), c-IAP1, c-IAP2, ILP2 (Proteína 2 tipo IAP), ML-IAP (IAP de Melanoma)/Livin, NAIP (Proteína Inhibidora de Apoptosis Neuronal) y survivina. El péptido que precede al BIR2 (Repetido-2 de Baculovirus IAP) en XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 (mostrado en rojo) es el responsable de inhibir a las caspasas 3 y 7 en mamíferos. Solamente el dominio BIR3 de XIAP puede inhibir potentemente a la caspasa 9. CARD, Dominio Reclutador de Caspasas, Dominio RING, nuevo gen realmente interesante [22].

Las actividades de XIAP y otras IAPs no solamente están restringidas a la inhibición de las caspasas, se han obtenido datos en donde algunas de estas proteínas intervienen en la regulación del ciclo celular, degradación de proteínas y en las cascadas de transducción de la señal independientes de caspasas.

ML-IAP/BIRC7 se encuentra en niveles elevados en varias líneas celulares de cáncer, pero particularmente en las líneas celulares de melanoma. Solamente posee un dominio BIR y es capaz de inhibir a las caspasas 9, 3 y 7 [18].

NAIP/BIRC1, otro de los miembros de esta familia, posee un dominio BIR, y aunque no está muy relacionado con los BIRs de las demás IAPs, puede inhibir algunos procesos de muerte celular; sin embargo, sus funciones exactas aún no han sido descritas [18].

ILP-2/BIRC8 posee un dominio BIR y puede inhibir a la caspasa 9 [23].

BRUCE/BIRC6 es una proteína que se encuentra en el aparato de Golgi, posee sólo un dominio BIR, con el que es capaz de inhibir a la procaspasa 9 [24] y en el carboxilo terminal tiene otro dominio con actividad enzima conjugadora de ubiquitina (E2) [25].

Finalmente, la proteína survivina/BIRC5, única entre las IAPs de mamíferos, contiene solamente un dominio BIR y le falta el dominio RING en el extremo carboxilo. En contraste a c-IAP1 y c-IAP2, la survivina no tiene un dominio que recluta caspasas, el cual es necesario para la interacción con los TRAFs (factores asociados al receptor de TNF) [26].

### **Survivina**

En 1997, Ambrosini y col., [27] identificaron a un nuevo miembro de la familia IAP, survivina. A diferencia de las otras proteínas IAPs, la survivina se expresa durante el desarrollo embrionario y fetal, siendo indetectable en tejidos adultos normales [28]. Se ha reportado que esta proteína se expresa en los cánceres humanos más comunes, incluyendo cáncer de pulmón, estómago, colon, páncreas, próstata y mama [27].

La survivina tiene la capacidad de unir e inhibir el procesamiento de la pro-caspasa-3 y la pro-caspasa-7 y se une a estas caspasas activas *in vitro* [29]. Indirectamente puede inhibir a la caspasa 9, ya que como intermediario requiere a la proteína HBXIP (proteína que interactúa con la proteína X de la hepatitis B), para unir a esta caspasa e impedir su unión a Apaf-1, y en consecuencia su activación [30].

Se ha sugerido que la survivina tiene un papel más selectivo para inhibir la apoptosis mitocondrial. Altieri y col., en el año 2003, demostraron que cuando la survivina es inhibida, la muerte celular tiene las características de la vía intrínseca, como la liberación de citocromo c, la activación de la caspasa 9, el requerimiento de componentes del apoptosoma [31] y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial [32]. Además, ratones heterocigotos para la survivina mostraron ser más sensibles a la muerte dependiente de la mitocondria [31].

La survivina es regulada durante el ciclo celular, se expresa en la fase G2-M y se asocia directamente con los microtúbulos del huso mitótico [33].

La expresión de la survivina es dependiente de la etapa del ciclo celular, presenta una expresión incrementada en la fase G2/M y un rápido decline en la fase G1 [34]. Esta expresión es regulada a nivel transcripcional por las cajas CDE/CHR (elemento dependiente del ciclo celular/región de homología a genes del ciclo celular) presentes en el promotor de survivina [31]. Pero además, cambios en la estabilidad de la proteína participan en la regulación de su expresión. En células en interfase se ha observado una poliubiquitinación y degradación de survivina por la vía del proteosoma, y esto es dependiente de una región carboxilo terminal intacta río abajo del dominio BIR [35]. También se ha visto que la estabilidad de la proteína aumenta durante la metafase debido a la fosforilación de survivina en la treonina 34 (Thr34), por el complejo ciclina B1/cdc2 [36].

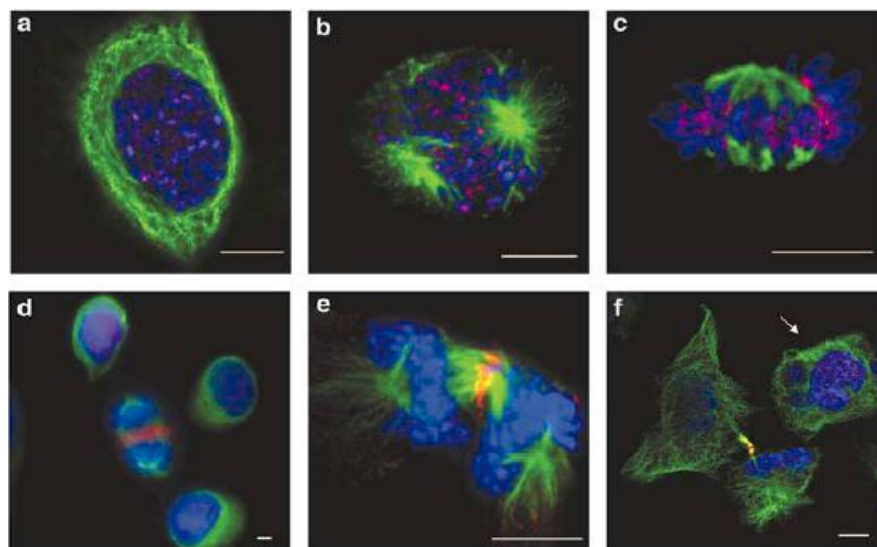
En estudios de perfiles de genes, la survivina fue identificada como el cuarto "transcriptoma" expresado en la mayoría de los cánceres humanos más comunes, pero no en los tejidos normales. Se ha sugerido que el gen de la survivina está desregulado globalmente en las células transformadas, ya que se encuentra sobreexpresado en todas las etapas del ciclo celular, no solo en la mitosis. Diversos eventos involucrados en el proceso carcinogénico, han sido implicados en la desregulación de la survivina, como son, la amplificación del locus de la survivina en neuroblastoma, la desmetilación selectiva del exón 1 de la survivina en cáncer de ovario, pero no en ovarios normales, e

importantemente, en células sin p53 silvestre. La survivina ha sido identificado como uno de los genes reprimidos transcripcionalmente por p53 silvestre, a través de un elemento bipartito de respuesta a p53 en el promotor de la survivina, o por cambios en la estructura de la cromatina que afectan la accesibilidad al promotor [31].

### ***Papel de la survivina en el ciclo celular***

La survivina se expresa principalmente en la fase G2/M del ciclo celular y disminuye en la fase G1 [37]. La fosforilación de la survivina en la Thr34 por p34<sup>cdc2</sup>/ciclinaB1 se ha visto asociada con el aumento en la estabilidad de la survivina durante la metafase [36].

En etapas tempranas de la mitosis la survivina se localiza en los centrómeros (Figura 3a), al disociarse la envoltura nuclear en la prometafase la survivina permanece en los centrómeros unida a un nuevo eje para-polar (Figura 3b).



**Figura 3.** Localización subcelular endógena de la expresión de la survivina durante el ciclo celular. Se puede observar la survivina en rojo y la tubulina en verde. La survivina se excluye del núcleo en la fase G2 del ciclo celular [38].

En la metafase los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial y la survivina se une a los cinetocoros (Figura 3c). Durante la anafase la survivina se puede ver en la región media de la placa, mientras los cromosomas migran hacia los polos (Figura 3d), en la telofase la survivina se localiza en los residuos

del aparato mitótico (Figura 3e) y finalmente, en la citocinesis la survivina se localiza en la parte media del surco (Figura 3f) [38].

En el ciclo celular, existe una cascada de señalización denominada "checkpoint del huso", en donde se monitorean las interacciones entre los cinetocoros de los cromosomas y los microtúbulos del huso mitótico, para prevenir una separación precoz de las cromátidas hermanas [39].

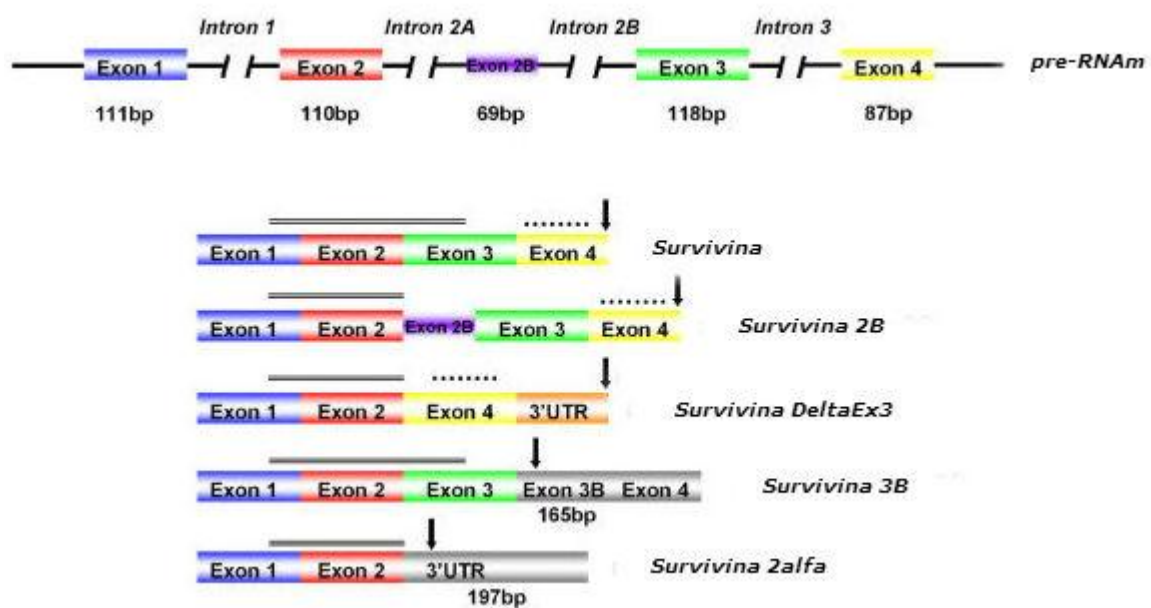
Aurora B es la primera proteína que es implicada como un regulador de la unión bipolar de los microtúbulos del huso a los cinetocoros. Aurora B es una cinasa que regula la segregación de los cromosomas y la citocinesis. Aurora B se encuentra físicamente asociada con la proteína interna del centrómero (INCENP) en la mitosis y tiene interacciones con la survivina, asociándose a la survivina como una proteína pasajera cromosomal [40].

El complejo pasajero cromosomal es el término inicialmente utilizado para describir a cierto número de proteínas que poseen una localización característica durante la mitosis. Son proteínas involucradas en la coordinación de los eventos cromosomales y del citoesqueleto durante la mitosis. Dichas proteínas pasajeras están presentes en las células como un complejo con al menos cuatro miembros: Aurora B, INCENP; survivina y borealina. Conforme la mitosis progresa, este complejo se mueve en una serie de locaciones del huso mitótico de la célula, la cinasa va activando una serie de sustratos clave en el lugar y tiempo específicos. Las funciones que lleva a cabo un complejo pasajero cromosomal a través de su actividad incluyen modificaciones de la cromatina, corrección de los errores de unión al cinetocoro, aspectos del "checkpoint del huso" en la mitosis, así como el ensamblaje de un huso bipolar estable y el cumplimiento de la citocinesis. De tal manera que el complejo pasajero cromosomal provee un mecanismo esencial para la regulación mitótica [41].



### Isoformas de la Survivina

Se han reportado cinco isoformas de la survivina generadas por splicing alternativo (Figura 3). Mahotka y col., en 1999, describieron tres variantes, la survivina tipo, la survivina 2B y la survivina DeltaEx3 [42]; la survivina 3B, descrita en el 2004 por Badran y la survivina 2alfa [43], reportada por Caldas en el 2005 [44].



**Figura 4.** Isoformas de la survivina. El pre-mRNA de la survivina genera por lo menos cinco transcritos maduros. Los rectángulos representan los exones, con los tamaños indicados en la parte de abajo. El tamaño de las secuencias de nucleótidos adicionales en la survivina 3B y en la survivina 2alfa, se muestran en las isoformas. Las flechas indican los codones de paro, las líneas punteadas señalan los dominios de cola enrollada y las dobles líneas, los dominios BIR en las distintas isoformas [45].

La survivina tipo tiene una estructura de 4 exones y 3 intrones, y se ha descrito como una isoforma principalmente citoplasmática, con una relación 6:1 survivina citoplasmática: nuclear.

La isoforma 2B es generada por la retención de parte del intrón 2 como un exón críptico. En esta isoforma el dominio BIR es interrumpido por la introducción del exón 2B, pero el marco de lectura no sufre cambios y

conserva la región carboxilo terminal. Esta isoforma pierde la capacidad antiapoptótica [42]. La survivina 2B se localiza principalmente en el citoplasma [38]. Esta isoforma no se une a los centrómeros ni a los microtúbulos de la zona media del huso [46], no interactúa con las proteínas pasajeras cromosomales y tampoco tiene un papel en la mitosis [47].

La survivina DeltaEx3 es generada por la pérdida del exón 3. Esta isoforma sufre un cambio en el marco de lectura, lo cual resulta en un dominio BIR truncado, y una región carboxilo terminal única. A pesar de no tener el dominio BIR completo, esta isoforma retiene la función antiapoptótica similar a la de la survivina tipo y está sobreexpresada en tejido tumoral [42].

Esta isoforma posee una nueva señal de localización nucleolar, por lo cual se encuentra en el nucleolo, donde se degrada rápidamente por la vía del proteosoma, debido a la presencia de una señal de degradación. Ambas secuencias son necesarias para que la survivina DeltaEx3 retenga su capacidad antiapoptótica [48].

La survivina DeltaEx3 posee además una secuencia de localización mitocondrial y un dominio BH2 [49]. Interesantemente, se ha descrito un homólogo viral de la survivina DeltaEx3 que se localiza en la mitocondria y que inhibe la apoptosis por medio de su asociación con Bcl-2 y con la supresión de la activación de la caspasa 3, en una forma dependiente de su dominio BIR [50].

Se ha observado que la survivina tipo puede formar heterodímeros con la survivina DeltaEx3, y que estos complejos se localizan en la mitocondria, donde podrían de una manera sinérgica inhibir la apoptosis mitocondrial [38].

La survivina DeltaEx3, a diferencia de la survivina tipo, no se une a los centrómeros, ni a los microtúbulos de la zona media del huso mitótico [46], no interactúa con las proteínas pasajeras cromosomales *in vivo*, y se ha sugerido que no interfiere en las actividades de la survivina tipo en la mitosis [47].

Estudios recientes reportaron que la survivina 2B y la survivina DeltaEx3 pueden co-inmunoprecipitar con la survivina tipo, al ser transfectadas

transitoriamente en las células. Esto demuestra que las variantes generadas por el splicing alternativo de la survivina pueden heterodimerizar entre ellas [38].

Por otro lado, Noton y colaboradores confirmaron estos hallazgos para la survivina 2B en estudios realizados *in vivo* y demostraron por primera vez en estudios *in vitro* que las isoformas survivina 2B y la survivina DeltaEx3 interactúan directamente con la survivina tipo [47].

Se ha sugerido que la survivina 2B actúa como un antagonista natural de la survivina a partir de la unión competitiva de los patrones heterólogos de interacción o mediante la formación de transcritos inactivos de survivina [46].

Por otro parte, la disminución de la survivina 2B puede debilitar su función antagonista con respecto a la survivina, y más aún, puede permitir la generación de más transcritos de survivina y/o de survivina DeltaEx3 debido a que las tres variantes producidas por splicing alternativo de la survivina provienen de un mismo precursor de RNA heterogéneo nuclear (RNAhn); por lo tanto un decremento en la survivina 2B pudiera resultar en el desarrollo, invasión y anaplasia del carcinoma [51].

Estas isoformas de la survivina poseen distintas localizaciones subcelulares, tanto la survivina tipo como la survivina 2B se encuentran en el citoplasma, mientras que la survivina DeltaEx3 se encuentra localizada en el núcleo, ésta última al poseer una señal de localización mitocondrial se cree que pudiera pertenecer a la poza subcelular mitocondrial [52].

La survivina 3B, descrita en el 2004 por Badran y colaboradores, posee un nuevo exón (3B) derivado de una porción del intrón 3. Esto resulta en la adquisición de un nuevo codón de paro dentro del exón 3B, por lo que es una proteína trunca, carente de la región carboxilo terminal [43]. A pesar de esto, esta variante es citoprotectiva y es capaz de interactuar con las proteínas del complejo pasajero cromosomal [53].

Por último, la survivina 2alfa consiste en dos exones, el exón 1 y el exón 2, y una porción del intrón 2 como parte de la región 3'. También adquiere un nuevo codón de paro, que resulta en una proteína trunca (8.5 kDa), con un dominio BIR truncado y una carencia de la región carboxilo terminal. Debido a

lo anterior, esta isoforma no retiene la capacidad antiapoptótica y no participa en la mitosis.

La survivina 2alfa co-localiza con la survivina tipo en el núcleo y en el citoplasma y se expresa en niveles elevados en células transformadas, en comparación con las no transformadas. Se ha visto que también puede interactuar con la survivina tipo, y se ha sugerido que podría atenuar su actividad antiapoptótica [44].

### ***Distribución celular de la survivina***

Se han descrito diferentes distribuciones de la survivina sin mostrar una relación exacta entre las poblaciones y sus isoformas. La survivina nuclear se localiza en los cinetocoros de los cromosomas en metafase y en la zona media del huso en anafase. Mientras que la población citosólica se encuentra asociada a los microtúbulos de la interfase, los centrosomas, los polos del huso y los microtúbulos del huso mitótico en la metafase y la anafase [54]. La región carboxilo terminal de la survivina es la que le permite asociarse a la tubulina [34].

La survivina citosólica está asociada también con cdc2 y es fosforilada en la treonina 34, mientras que la nuclear no [54]. Se ha observado que esta fosforilación de la survivina es necesaria para su interacción con la caspasa 9 y la inhibición de la apoptosis dependiente de esta caspasa [55].

También se ha descrito una población mitocondrial, que se encuentra en el espacio intermembranal en las células transformadas, pero no está presente en tejidos normales. Ante un estímulo de muerte, la survivina es liberada al citoplasma, e inhibe la activación de las caspasas 9 y 3, de esta forma inhibe la apoptosis y permite la progresión del tumor [56].

Clínicamente, se ha investigado la distribución subcelular de la expresión de la survivina y sus isoformas pues al parecer puede llegar a ser un factor crucial para su función en las células tumorales. Se ha observado que la detección inmunohistoquímica nuclear de la survivina de las células tumorales se encuentra relacionada con un pronóstico favorable en pacientes con

carcinoma gástrico [57], cáncer de mama [58], cáncer de vejiga [59] y osteosarcoma [60], mientras que la detección de la proteína en el citoplasma de las células tumorales en estos reportes no demuestra un factor pronóstico.

En contraste con estos estudios, se encontró que la survivina nuclear se encuentra asociada con características clínicas desfavorables y un pobre pronóstico en malignidades de esófago [61], en linfoma del manto celular [62] y en carcinoma de pulmón de células no pequeñas [63]; estas diferencias en el pronóstico con respecto a la distribución de la survivina nuclear entre los diferentes estudios es probablemente tumor-específico [63].

En otros estudios en los que analizaron los niveles de la survivina o bien la expresión de la proteína en el citoplasma de las células cancerosas, se encontró relacionada la expresión en el citoplasma con un pobre pronóstico en varios tipos de cánceres, entre ellos, linfomas de células B [64], carcinoma colorectal [65], neuroblastoma [66], cáncer gástrico [67], cáncer colorectal [68], carcinoma de vejiga [69], y en tumores epiteliales de ovario [70].

En un estudio realizado por Ponnelle y colaboradores en el año 2005, se sugirió una posible relación entre una mejor tasa de sobrevivencia de los pacientes ligada a la expresión citoplasmática o nuclear de la survivina, así como al potencial apoptótico de sus isoformas producidas por splicing alternativo [71].

### ***Isoformas de la survivina y el cáncer***

La expresión de las isoformas de survivina se ha estudiado en diversos tipos de cáncer, encontrándose una correlación con los estadios del tumor. Se ha mostrado que las isoformas tipo y DeltaEx3 se encuentran sobreexpresadas y que algunas veces esta sobreexpresión está directamente relacionada con el estadio del tumor. Al contrario, la isoforma 2B se ha encontrado en niveles bajos en diferentes tipos de tumor y sus niveles correlacionan de manera negativa con el estadio. Estas características se han observado en neuroblastoma [72], en carcinoma renal [52], en tumores cerebrales malignos y gliomas [73], en carcinomas gástricos [51,74], en cáncer de mama [75], y en cáncer

cérvicouterino [76]. En la tabla 1, se muestra la relación entre algunos tipos de cáncer y las isoformas que se expresan en cada uno de ellos.

<b>Cáncer</b>	<b>Isoforma</b>	<b>Notas</b>
Carcinoma renal, [77]	Surtipo	Alta expresión de la survivina tipo
Neuroblastoma, [78]	Surtipo, Sur2B	Estadios avanzados alta expresión de la survivina tipo. Expresión de survivina 2B en casos favorables
Leucemia de células T en adulto, [79]	Surtipo	Expresión en todos los casos. En células normales no se expresa.
Gástrico, [80]	Surtipo	Expresión en 68% muestras de pacientes. Expresión en la mucosa normal asociada a la presencia de <i>H. pylori</i> .
Vejiga, [81,82]	Surtipo	Se expresa en 30% de los casos y no hay una relación entre la expresión de la survivina y la recaída de los pacientes.
Páncreas, carcinoma de colón y mama, [83]	Surtipo	Expresión de altos niveles en células tumorales.
Leucemia aguda mielodisplástica, [43]	Sur3B	Se encontró la expresión de la sur3B en muestras de pacientes.
Gástrico [51]	Surtipo, Sur2B, SurDeltaEx3	Expresión en todos los casos de las tres isoformas. La expresión de surtipo y la surDeltaEx3 está relacionada con el estadio, el tipo histológico y la invasión.
Mama, [84]	Surtipo, Sur2B, SurDeltaEx3	Expresión de la surtipo en 93.6% de los carcinomas, 100% en metástasis de axila, 22.7% tejido normal. Altos niveles de expresión de surDeltaEx3 y sur2B en metástasis nodal.
Ovario, [85]	Surtipo	La localización de la surtipo es nuclear en tumores primarios y citopasmática en estadios avanzados.
Meduloblastoma, [86]	Surtipo	Correlación con altos niveles de expresión de la surtipo y mal pronóstico. Asociación entre el porcentaje positivo de surtipo y el subtipo histológico.
Colorectal, [87]	Surtipo, Sur2B	Alta expresión de la sur2B y la surtipo en tumores.
Sarcoma de tejido suave, [88]	Surtipo, Sur2B, SurDeltaEx3	La elevada expresión de las tres isoformas correlaciona con el mal pronóstico. La sobreexpresión de la surDeltaEx3 está asociada a estadios más avanzados.
Cérvicouterino [76]	Surtipo, Sur2B, SurDeltaEx3	Expresión de las tres isoformas. Altos niveles de expresión de sur2B y la surDeltaEx3 en adenocarcinomas.
Tumores pediátricos, [89]	Surtipo, Sur2B, SurDeltaEx3	Expresión de las tres isoformas. La surtipo está expresada de forma dominante y su expresión está asociada con el desarrollo del tumor.
Queratinocitos, [90]	Surtipo	La survivina tipo está altamente expresada.
Leucemia pediátrica, [91]	Sur2B	Se asocia la baja expresión de sur2B con el grupo de alto riesgo.

**Tabla 1.** Expresión de las isoformas de la survivina en diferentes tipos de cáncer.

## **Esferoides**

Los esferoides son un tipo de cultivo en donde se crean cúmulos de células tumorales in vitro, simulando tumores sólidos. Se ha demostrado que las células en esferoides cambian su expresión génica, ya que se forman microambientes debido al suministro diferencial de oxígeno y nutrientes a lo largo de las diferentes capas del esferoide.

Los esferoides tumorales multicelulares (MTS), han sido utilizados ampliamente en la investigación biomédica debido a que mimetizan de una mejor forma la situación in vivo de los verdaderos tumores que lo que lo hacen los cultivos en monocapa [92].

Estos agregados poseen una compleja organización tridimensional lo que permite las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Además de que contienen una geometría morfológica y fisiológica bien establecida [93].

Los esferoides reestablecen las características morfológicas, funcionales y de transporte que corresponden a un tejido in vivo. En particular, las células tumorales en los esferoides restauran un modelo de diferenciación similar al que se observa in vivo, el cual es mantenido por varias semanas de cultivo. Estas características son iniciadas y mantenidas por el ensamblaje de la matriz extracelular y por la red compleja tridimensional de las interacciones célula-célula y célula-matriz, las cuales están ausentes en los cultivos de monocapa. Además, la estructura tridimensional del esferoide es relevante para el modelaje de la distribución y de la función de algunos factores en los tejidos, así como la penetración, unión y bioactividad de las drogas.

Los esferoides se aproximan a muchas características de los nódulos de tumor avasculares, de micrometástasis o a regiones intervasculares de grandes tumores sólidos con respecto a la cinética de crecimiento. Análogos a los tumores sólidos y a las metástasis in vivo, el crecimiento de esferoide puede ser matemáticamente modelado por la ecuación de Gompertz como también por varios modelos matemáticos biológicos que han sido aplicados a tumores [94].

Generalmente, dependiendo de la línea celular, cuando los esferoides tienen un diámetro mayor o igual a 500  $\mu\text{m}$ , desarrollan un centro necrótico (a causa del gradiente de oxígeno y nutrientes), una capa de células quiescentes y células que proliferan hacia la periferia [93]. Hacia el interior los gradientes de oxígeno y nutrientes están presentes, análogos a la situación de las regiones de los tumores sólidos. Estas variaciones en la fisiología celular están asociadas a alteraciones en la sensibilidad de una amplia variedad de terapias anti-cáncer en tumores y en esferoides.



## **Justificación**

---

La survivina, es una proteína inhibidora de la apoptosis. Esta proteína está sobreexpresada en la mayoría de los cánceres y se le ha asociado con la resistencia a la quimioterapia, con el incremento de la recurrencia del tumor y con la corta sobrevida del paciente.

Se han descrito 4 variantes por splicing de la survivina. Estas isoformas son diferentes estructuralmente y se ha sugerido que debido a esto, tienen un papel diferente en la apoptosis y en el ciclo celular. Aunque aún falta mucho por explicar que papel desempeñan en la progresión del cáncer y en algunos otros procesos.

Los esferoides son un modelo de estudio del cáncer en donde se crean cúmulos de células tumorales *in vitro*, simulando tumores sólidos. Los MTS han sido utilizados ampliamente en la investigación biomédica debido a que mimetizan de una mejor forma la situación *in vivo* de los verdaderos tumores que lo que lo hacen los cultivos en monocapa. Dentro del esferoide, al incrementarse el número de células y compartimentalizarse, se incrementa también su resistencia a la presencia de diversos fármacos y terapias, tal y como sucede en tumores *in vivo*, este mecanismo es conocido como resistencia multicelular.

El presente proyecto pretende colaborar en el conocimiento del análisis de las isoformas de la survivina en un modelo tridimensional. Esto nos ayudará a comprender los mecanismos que regulan el mantenimiento del tumor *in vivo* y a conocer un poco más el papel que desempeñan las isoformas en el cáncer.

## ***Hipótesis***

---

En los esferoides multicelulares existe una expresión diferencial de las diferentes isoformas de la survivina. Esta expresión diferencial es el reflejo de su participación en los procesos de proliferación y apoptosis de las diferentes poblaciones celulares.

## **Objetivo general**

---

Comparar los niveles de las isoformas de survivina en cultivos de esferoides multicelulares *versus* monocapa y determinar si la expresión de alguna isoforma afecta el crecimiento de los esferoides o la resistencia a drogas.

## **Objetivos específicos**

---

1. Establecer el cultivo de esferoides de células de cáncer.
2. Determinar qué isoformas se presentan en líneas de cáncer en monocapa y en esferoides.
3. Determinar si hay heterogeneidad zonal en la expresión de las isoformas de survivina.
4. Determinar si la inhibición de alguna de las diferentes isoformas de survivina, modifica la sensibilidad de los esferoides a la apoptosis inducida por antineoplásicos.
5. Determinar si la inhibición específica de alguna de las isoformas de la survivina, modifica la cinética de crecimiento del esferoide.

## **Metodología**

---

### **Líneas celulares**

**HeLa.** Línea celular derivada de adenocarcinoma de cérvix. Se ha reportado que esta línea celular contiene el virus del papiloma humano tipo 18. (Número: ATCC CCL-2).

**HEK293.** La línea celular HEK293 es una línea de riñón embrional humano transformada con adenovirus humano tipo 5. (Número: ATCC CRL-1573).

**SiHa.** Línea celular derivada de carcinoma escamoso de cérvix. Esta línea tiene integrado el virus del papiloma humano tipo 16. (Número: ATCC HTB-35).

**SW 48.** Línea celular derivada de adenocarcinoma de colon. (Número: ATCC-CCL-231.)

**KB.** Línea celular derivada de un carcinoma epidermoide de la boca. Se ha reportado que contiene el virus del papiloma humano tipo 18. (Número: ATCC CCL-17).

**HepG2.** Línea celular derivada de un carcinoma hepatocelular. (Número: ATCC HB-8065).

### **Cultivo celular de células en monocapa**

Las líneas celulares se cultivaron en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> (v/v). Para la criopreservación, se preparó una suspensión de 2x10<sup>6</sup> células/ml/criovial en medio completo más DMSO (10%), se congelaron gradualmente y se conservaron en nitrógeno líquido.

### **Cultivo de esferoides**

Las líneas celulares se cultivaron usando la técnica de "Liquid overlay" descrita por Yuhas y col. [95]. Brevemente, se sembraron 500,000 células en cajas de Petri con una capa delgada de agarosa al 2% durante una semana, posteriormente se pusieron en una incubadora rotatoria a 37°C con medio Leibovitz L-15. El medio se cambió cada dos días y los esferoides malformados

se eliminaron. El crecimiento de los esferoides se evaluó midiendo el diámetro usando una reglilla calibrada.

### ***Procedimiento Histológico***

Los esferoides se fijaron en formalina. Después de 1 día de fijación, los esferoides se transfirieron a moldes pequeños de plástico para embeberlos. Los moldes se llenaron con agarosa al 2% disuelta en formaldehído al 4%. Los moldes se pusieron en hielo y una vez gelificada la agarosa, se transfirió a los cassettes de tejido, los cuales fueron rutinariamente procesados con diferentes soluciones. Una vez procesados, la agarosa con los esferoides se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  para laminillas.

### ***Inmunocitoquímica***

Las secciones de los esferoides se incubaron con el marcador de proliferación celular Ki-67 y con el marcador de quiescencia p27<sup>KIP</sup> y con anticuerpos para la survivina y la survivinaDeltaEx3. Brevemente, las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas en PBS y puestas en un Buffer de citrato de sodio 10 mM, pH 6.0. La exposición del antígeno se realizó con una olla de presión a 120°C por 2 min. Posteriormente, las laminillas se lavaron con PBS y la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con la incubación con el reactivo en cámara húmeda. Las laminillas fueron lavadas con PBS, y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de una dilución del anticuerpo primario y se incubaron de 1 a 4 horas a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron con PBS, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con Polymer-HRP (Biocarta, UK) y se incubaron por una hora en la cámara húmeda. Pasado este tiempo, las laminillas se enjuagaron en PBS y se incubaron con el cromógeno-sustrato DAB (DakoCytomation, USA) hasta que se viera el color deseado. Como control negativo, se omitió el anticuerpo primario. Las laminillas se contratiñeron con hematoxilina y se montaron con Aquamount. Los anticuerpos utilizados fueron: Ki-67 (DakoCytomation), p27KIP (Cell signaling), survivina (Santa Cruz) y survivina DeltaEx3 (Abcam).

## **TUNEL**

Los cortes de los esferoides se analizaron con el ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling), para identificar a las células apoptóticas. Se utilizó el Kit ApopTag (Chemicon International) de acuerdo al protocolo de la compañía. Brevemente, las laminillas se trataron con proteinasa K por 15 min y se incubaron con el Buffer terminal deoxynucleotidyl transferase por 1 h a 37°C y se lavaron. Los nucleótidos que se incorporaron marcados con fluoresceína se visualizaron con un microscopio de fluorescencia.

## **Construcción de los RNAs de interferencia**

### *Clonación del promotor humano U6 en el vector pGEMTEasy*

El promotor U6 se amplificó de sangre humana con primers específicos y se clonó en el vector pGEMTEasy.

El primer antisentido se diseñó con un sitio de restricción para la enzima Age I. El promotor U6 se amplificó de DNA genómico de sangre humana por medio de PCR usando los siguientes primers y condiciones:

U6 Sentido 5' CAGTGGAAAGACGCGCAGGCAA 3'

U6 Antisentido 5' ACCGGTGTTCGTCCTTCCACAAG 3'

Condiciones: 95°C 10 min. (1 ciclo); 95°C 1 min., 64°C 1 min., 72°C 2 min. (40 ciclos); 72°C 20 min. (1 ciclo).

El producto se analizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La banda específica se purificó y cuantificó. El promotor de U6 se clonó en el vector pGEM-T Easy de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

### *Diseño de las secuencias*

Se diseñaron secuencias para inhibir a la survivina tipo y a la survivina DeltaEx3. El ARN de interferencia para la survivina tipo está dirigido a la secuencia 5'gacgaccccatagaggaaca3' que se encuentra entre los exones 1 y 2, y el de la survivina DeltaEx3 a la secuencia 5'cggtggcttacgcctgtaata3' que

se encuentra entre los exones 2 y 4. Estas secuencias fueron analizadas por Blast y diseñadas con los sitios para las enzimas Age I, Spe I y Pst I. Las secuencias seleccionadas no tienen sitios de restricción para alguna enzima.

Los oligos diseñados para los RNAs de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 son:

Oligos 1 y 2 Survivina

```
5' ccggacgaccccatagaggaaca 3'
3' tgctggggtatctccttgatc 5'
```

Oligos 3 y 4 Survivina

```
5' ctagtgttcctctatggggtcgtccggttttctgca 3'
3' aacaaggagataccccagcaggccaaaaag 5'
```

Oligos 1 y 2 Survivina DeltaEx3

```
5' ccggacgaccccagcaaaggaaaa 3'
3' tgctggggtcgttcctttgatc 5'
```

Oligos 3 y 4 Survivina DeltaEx3

```
5' ctagttttcctttgctggggtcgtccggttttctgca 3'
3' aaaaggaaacgaccccagcaggccaaaaag 5'
```

Cada par de oligos se alineó y esta alineación se verificó en geles de acrilamida al 12%, comparando la alineación con los oligos no alineados.

El primer par de oligos de ambos RNAs se clonó con las enzimas Age I y Spe I. Para el segundo par se utilizaron Spe I y Pst I. Estos RNAs de interferencia fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega), bajo el control del promotor de U6 humano. Como plásmido control se utilizó el vector que sólo tiene clonado el promotor.

Para que las transfecciones pudieran ser estables, las construcciones de los RNAs, fueron subclonadas en el vector pQCXIP (Clontech).

### **Transfección y generación de las líneas celulares estables**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  de células 293 y HeLa en cajas de 60mm. Al día siguiente, las células se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y con  $1\mu\text{g}$  de los vectores; pGEMTeasy/U6, pGEMTeasy/RNAiSurvivina, pGEMTeasy/RNAiSurvivinaDeltaEx3, pQCXIP y pQCXIP/RNAiSurvivinaDeltaEx3, pcGFP y pcSurDelta (Estos dos últimos proporcionados amablemente por la Doctora Sally Wheatley), siguiendo las indicaciones del protocolo.

Para generar las líneas celulares estables, las células transfectadas se seleccionaron con geneticina ( $700\mu\text{g/ml}$  por 15 días) o con Puromicina ( $3\mu\text{g/ml}$  por 10 días).

### **Ensayos de proliferación celular**

La proliferación celular *in vitro* se midió usando el Kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Brevemente, las células pcGFP y pcSurDelta se sembraron por triplicado en placas de 96 pozos, a una densidad de 500 células por pozo. Las células se analizaron a los 2, 4, 6 y 8 días. En cada punto se añadieron  $20\mu\text{l}$ /pozo de la solución 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium/phenazine ethosulfate y se incubaron por una hora. La absorbancia se leyó a 490 nm utilizando un lector de microplacas.

### **Ensayos de Viabilidad Celular**

Para determinar el LD50 de los antineoplásicos utilizados, se sembraron 15,000 células en placas de 96 pozos. Al día siguiente, las células se expusieron a varias concentraciones de la droga por el tiempo indicado. La viabilidad celular se determinó por el método de cristal violeta. Brevemente, las células se fijaron en etanol al 70% por 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se tiñeron con cristal violeta al 1% por 15 min, se lavaron varias veces, y la tinción se disolvió en ácido acético al 33%. La absorbancia se obtuvo a 570 nm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA.



Para analizar la resistencia de los esferoides expuestos a los fármacos. Las células se cultivaron como esferoides hasta llegar al tamaño de 1200  $\mu$ . Posteriormente, las células se disgregaron y se sembraron en monocapa, se realizaron 3 pases y se procedió a hacer el experimento de viabilidad.

### ***Ensayos de clonogenicidad***

Los ensayos se realizaron en placas de 48 pozos. En la primera columna de la placa se sembraron 4000 células por pozo y para el resto de la placa, se realizaron diluciones seriales subsecuentes 1:2. El medio se cambió cada 5 días. 12 días después la clonogenicidad se determinó por el método de cristal violeta. Se realizaron tres experimentos independientes.

### ***Ciclo celular***

La distribución del ciclo celular se analizó usando un aparato sorteador celular activado por fluorescencia (FACS) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Para la determinación de la distribución del ciclo celular, las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se trataron con el kit CycleTEST™ PLUS DNA reagent kit (BD Biosciences) de acuerdo al protocolo de la compañía. Para cada línea celular, se analizaron 30,000 células por triplicado. El porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular se calculó usando el software FACSDiva (BD Biosciences).

### ***Extracción de ARN total***

El ARN total de muestras de células en cultivo se extrajo con trizol y cloroformo. Y se precipitó con isopropanol. Brevemente, 1 millón de células se homogenizaron en trizol, se agregó cloroformo, se centrifugaron y la fase acuosa se precipitó con isopropanol. La pureza se comprobó con la relación 260/280 y la integridad con geles de agarosa.

### **Síntesis de ADN complementario**

Se sintetizó ADN complementario a partir del ARN total de las células cultivadas en monocapa y en esferoides. La síntesis se hizo a partir de 1 µg de ARN total usando hexámeros al azar, y la enzima transcriptasa reversa termoestable de la siguiente manera: 1 µg de ARN total se desnaturalizó a 65°C durante 5 min, se agregaron hexámeros sintetizados al azar, deoxinucleótidos y enzima transcriptasa reversa en el buffer adecuado. Se incubó por 50 min a 50°C, la reacción se paró a 85°C y se incubó durante 20 min a 37°C con RNAsa H.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa, semicuantitativo (PCR)**

Para amplificar el ADN complementario (ADNc), se utilizaron los siguientes componentes: deoxinucleótidos (dNTPs), buffer, enzima polimerasa ADN termoestable y primers específicos para el gen de interés. Las condiciones para este ensayo fueron: 2.5 unidades de la polimerasa Amplitaq, 2 mM de deoxinucleótidos, 10 picomolar de primers y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

La expresión del ARN mensajero se normalizó con la expresión de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para esto se utilizó un programa de densitometría, par obtener unidades arbitrarias de área y de intensidad de cada una de las bandas. Las bandas se normalizaron de acuerdo a la intensidad de la expresión de GAPDH y de acuerdo a cada gel.

En la amplificación del ADNc de las diferentes isoformas de la survivina, se diseñaron oligos específicos, así como ciclos y temperaturas. Las temperaturas y tiempos que se usaron son los siguientes:

#### **GAPDH**

Sentido 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3',

Antisentido 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC 3'

Condiciones: 95 °C 10 min (1 ciclo); 95 °C 30 seg, 60 °C 30 seg, 72 °C 30 seg (25 ciclos).

#### **Survivina**

Sentido 5' GCCATGAATTCATGGGTGCCCCGACGTTGC 3'

Antisentido 5' AGCTCTCTAGAGAGGCCTCAATCCATGGCA 3'.

Condiciones: 95°C 10 min. (1 ciclo); 95°C 30 seg., 72°C 2 min. (3 ciclos); 95°C 30 seg., 68°C 30 seg., 72 °C 1 min. (35 ciclos) y 72°C 5 min. (1 ciclo)

### **Survivina 2B**

Sentido 5' CGAGGCGGGCGGATCACGAGAG 3'

Antisentido 5' GCTCGATGGCAAGGAGCACTTT 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 94 °C 30 seg., 65 °C 30 seg., 72 °C 30 seg. (37 ciclos).

### **Survivina 3B**

Sentido 5' AGGGAGGGACTGGAAGCAAAGAAT 3'

Antisentido 5' ATTGTTGGTTTCATTGCCTTCTC 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 94 °C 30 seg., 57 °C 30 seg., 72 °C 30 seg. (40 ciclos) y 72 °C 5 min. (1 ciclo).

### **Survivina DEx3**

Sentido 5' ACGACCCCATGCAAAGGAAACCAACA 3'

Antisentido 5' AGCCCGGGAATCAAACAGCAAAAA 3'

Condiciones: 95 °C 10 min. (1 ciclo); 94 °C 30 seg., 63 °C 30 seg., 72 °C 1 min. (35 ciclos) y 72 °C 5 min. (1 ciclo).

Los productos en fase logarítmica se analizaron en geles de agarosa y acrilamida teñidos con bromuro de etidio y la intensidad de la banda se cuantificó por densitometría.

### **PCR en Tiempo Real**

Para realizar esta técnica se utilizaron los oligos específicos para cada una de las isoformas; survivina 2B, survivina 3B y survivivina Delta Ex3.

Se estandarizaron las condiciones para cada una de las amplificaciones de las isoformas de la survivina. Los productos en fase logarítmica se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Las bandas correspondientes a las isoformas se purificaron por columnas de extracción. Los productos purificados se cuantificaron y se preparó una curva estándar, (desde  $0.5 \times 10^{10}$  hasta  $0.5 \times 10^{20}$  copias).

Las condiciones para estos ensayos fueron: 2.5 unidades de la polimerasa Amplitaq Gold, Syber Green 1X, Fluoresceína 10 mM, 0.4 mM de deoxinucleótidos, 10 pM de primers y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Se utilizaron oligos para amplificar a los ARNs ribosomales y así poder normalizar la expresión. Los oligos utilizados fueron,

Sentido 5' CGTTGATTAAGTCCCTGCCCTT 3'

Antisentido 5' TCAAGTTCGACCGTCTTCTCAG 3'

Las temperaturas y tiempos que se usaron para la amplificación de las isoformas son los siguientes:

Survivina 2B: 95°C 10 min. (1 ciclo); 95°C 30 seg., 64°C 30 seg., 72°C 30 seg. (45 ciclos).

Survivina 3B: 95°C 10 min. (1 ciclo); 95°C 30 seg., 57°C 30 seg., 72°C 30 seg. (45 ciclos).

Survivina DeltaEx3: 95°C 10 min. (1 ciclo); 95°C 30 seg., 64°C 30 seg., 72°C 30 seg. (45 ciclos).

Finalmente se aumentó un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos de amplificación. Mediante esta aplicación se determinó la T<sub>m</sub> de los amplicones para comprobar su especificidad.

### ***Extracción de proteínas totales***

El botón celular se obtuvo con PBS. Se decantó el botón y se resuspendió en el buffer RIPA (1% de NP40, 0.5% de Deoxicolato de sodio y 0.1% de SDS en PBS, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, a una densidad de 5 millones de células/ml. Posteriormente, las células resuspendidas fueron pasadas 20 veces por una jeringa de 1 ml para romper las membranas. Se incubaron en hielo por 10 min y posteriormente se centrifugaron en una centrífuga refrigerada, a 10,000 rpm por 30 min. El sobrenadante fue recuperado como proteína total.

### **Western blot**

Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con leche sin grasa al 5% en TBS-Tween (0.1%) por una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con la solución de bloqueo y el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Al siguiente día, las membranas se lavaron cuatro veces con TBS-Tween 20 y se les aplicó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano por una hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron por dos horas y la unión del anticuerpo secundario se visualizó con quimioluminiscencia, usando el kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences). Se utilizó un programa de densitometría para obtener unidades arbitrarias de área y de intensidad de cada una de las bandas. Las bandas se normalizaron de acuerdo a la intensidad de la expresión de Actina. Los anticuerpos usados fueron: Cdk1 (51-9001917, BD Biosciences), p-Cdk1 (9111, New England Biolabs), Chk1 (2345, Cell Signaling), cyclin B (51-9001924, BD Biosciences), p27 (2552, New England Biolabs), nucleolin (sc-8031, Santa Cruz), survivina (Santa Cruz), survivina DeltaEx3 (Abcam) y el anticuerpo contra actina fue proporcionado amablemente por el Dr. Herrera (IPN).

## RESULTADOS

---

### **Cultivo de esferoides de líneas celulares de cáncer**

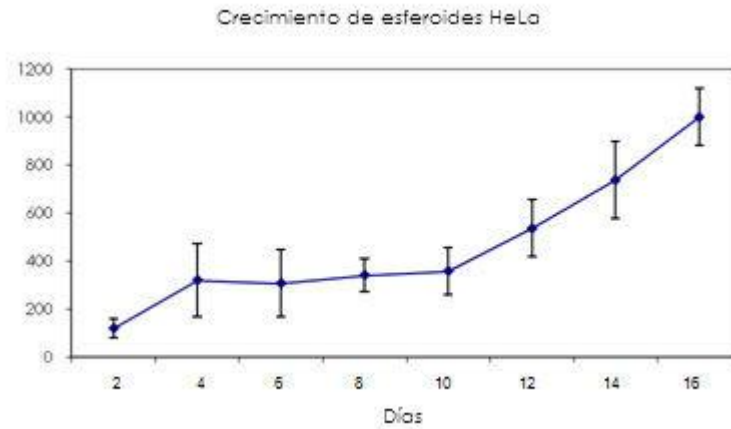
Se estableció el cultivo de esferoides tumorales multicelulares con la técnica de "liquid overlay" utilizando diferentes líneas celulares y pudimos observar que dependiendo de la línea se llega a un tamaño máximo (Tabla 2).

<b>Línea celular</b>	<b>Tamaño 4 semanas micras</b>
SiHa (CaCu)	1580 ± 85
HEK293 (Riñón)	1700 ± 23
Sw48 (Colon)	480 ± 91
KB (Cabeza y cuello)	2033 ± 57
HepG2 (Hígado)	2000 ± 78
HeLa (CaCu)	2000 ± 66

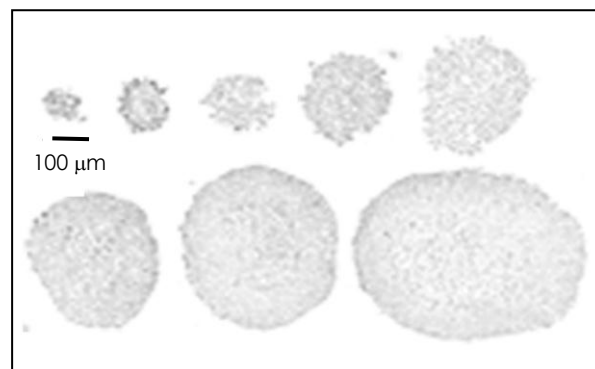
**Tabla 2.** Tamaño promedio de esferoides de diferentes líneas celulares a las 4 semanas de cultivo.

Con base a las características de los cultivos, seleccionamos a las líneas celulares HeLa y HEK293 para realizar el proyecto. De acuerdo al tamaño, elegimos esferoides de 200, 500 y 1200 micras. Los esferoides de HeLa crecieron rápidamente y alcanzaron los 550  $\mu\text{m}^3$  después de 16 días de cultivo (Figura 5). Mientras que los esferoides de HEK293 llegaron a este mismo tamaño en la mitad del tiempo (Figura 6).

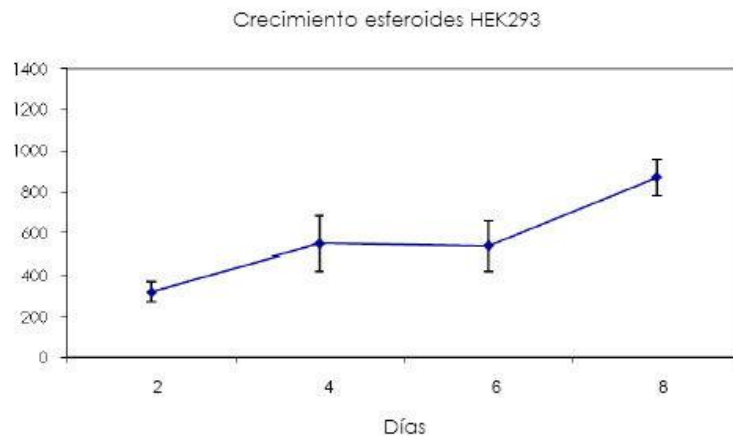
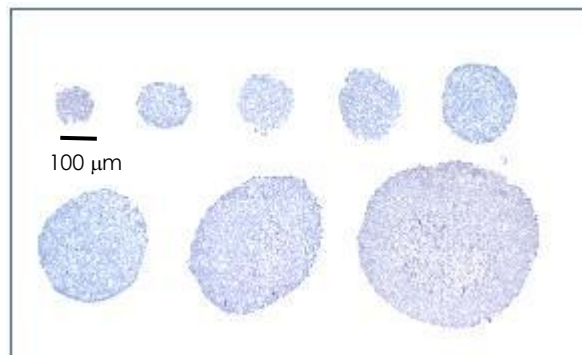
**A**



**B**



**Figura 5.** Crecimiento de esferoides multicelulares. Las células HeLa se tripsinizaron, se contaron y se crecieron como esferoides multicelulares usando la técnica de “liquid overlay”. **A)** Curva de crecimiento de los esferoides de HeLa. En los tiempos mostrados, 30 esferoides fueron medidos utilizando una regla microscópica. Los resultados se expresaron como el promedio. **B)** Características morfológicas de los esferoides. Los esferoides se embebieron en parafina y se realizaron cortes. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina. La línea representa 100  $\mu\text{m}$ .

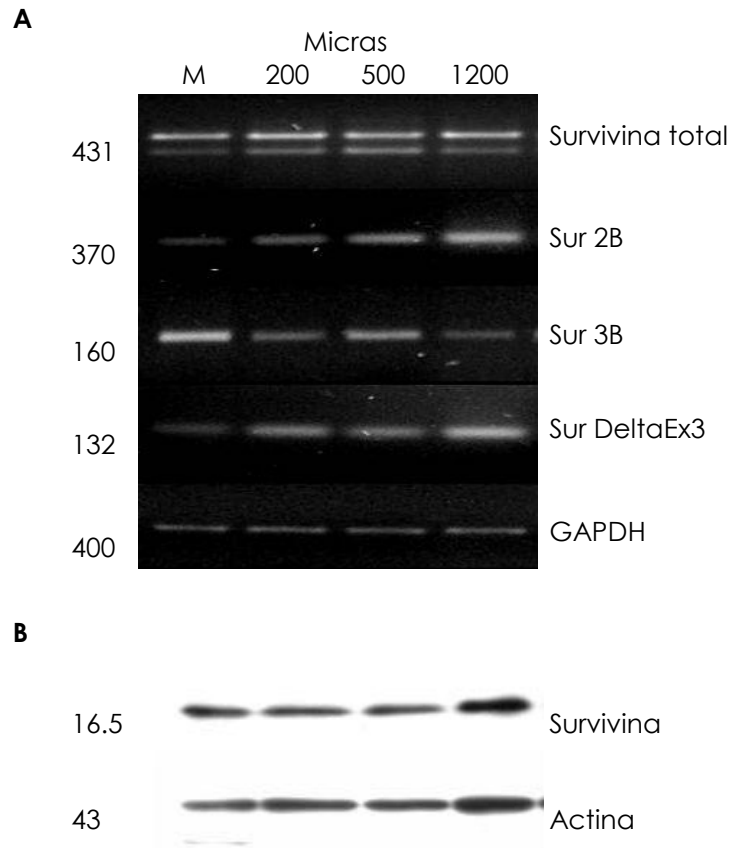
**A****B**

**Figura 6.** Crecimiento de esferoides multicelulares. Las células HEK293 se tripsinizaron, se contaron y se crecieron como esferoides multicelulares usando la técnica de “liquid overlay”. **A)** Curva de crecimiento de los esferoides de HEK293. En los tiempos mostrados, 30 esferoides fueron medidos utilizando una regla microscópica. Los resultados se expresaron como el promedio. **B)** Características morfológicas de los esferoides. Los esferoides se embebieron en parafina y se realizaron cortes. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina. La línea representa 100  $\mu\text{m}$ .



### **Expresión de las isoformas en cultivo de monocapa y esferoides**

Para analizar los niveles de expresión de las isoformas de la survivina en los esferoides, realizamos ensayos de RT-PCR y de Western blot. Utilizamos esferoides de HeLa (200, 500 y 1200 micras) y de su contraparte en monocapa (Figura 7).



**Figura 7.** Expresión de las isoformas de la survivina en los esferoides. ARN total y proteínas totales, se extrajeron de esferoides multicelulares de HeLa (200, 500 y 1200 micras) y de su control de cultivo en monocapa. Se utilizaron oligos que amplifican el marco completo de lectura de la survivina y oligos específicos para la survivina 2B, survivina DeltaEx3 y para la survivina 3B **A)** PCR semicuantitativo de las isoformas de la survivina. Como control se analizó la expresión de GAPDH. **B)** Western blot de survivina. La expresión de actina se utilizó como control de carga. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

Para obtener un análisis cuantitativo de la expresión de las diferentes isoformas de la survivina, realizamos RT-PCR en tiempo real. Los ensayos se hicieron con los mismos tamaños de esferoides y como control, el cultivo de monocapa de la línea celular.

La amplificación de la survivina tipo fue ineficiente debido al limitado número de regiones disponibles para su amplificación específica. Por lo tanto, analizamos el producto de PCR que amplifica a todas las isoformas de la survivina.

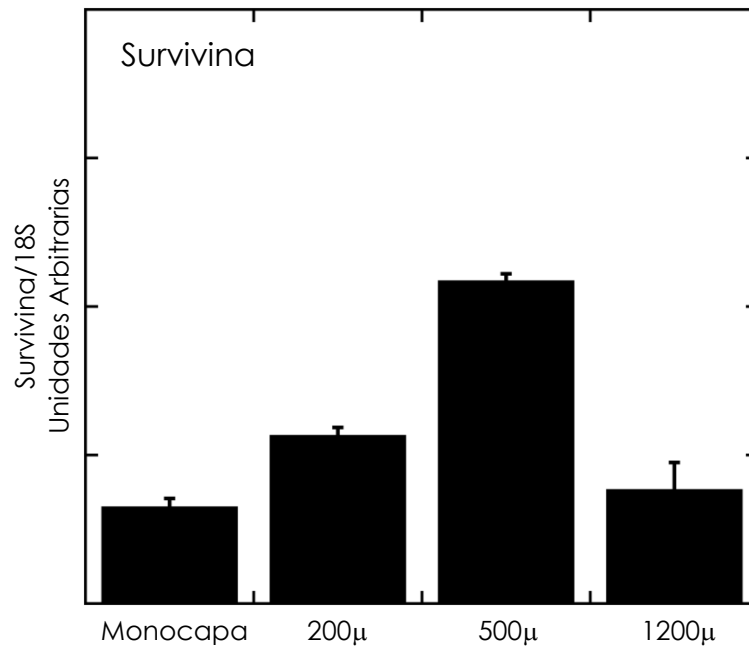
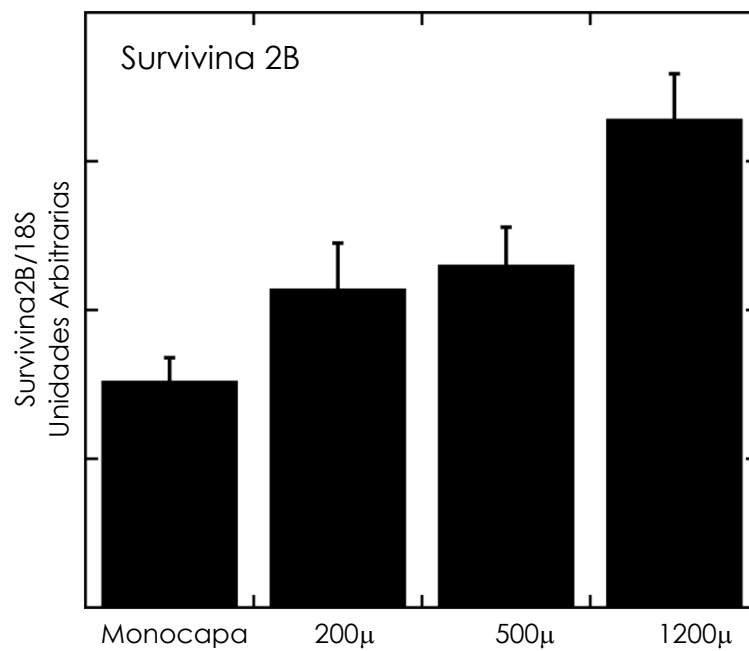
Estos análisis revelaron que los niveles de expresión de la survivina total se incrementan después de los estadios iniciales de la formación del esferoide y regresan a su expresión basal cuando el esferoide llega a su máximo tamaño (Figura 8A).

Los niveles de la survivina 2B se incrementan conforme el esferoide crece, llegando al máximo nivel en los esferoides de 1200 micras (Figura 8B).

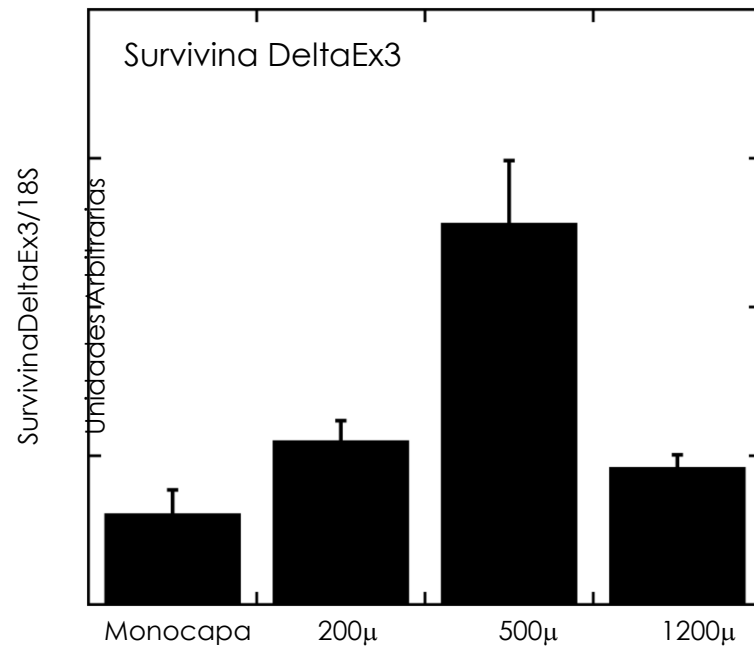
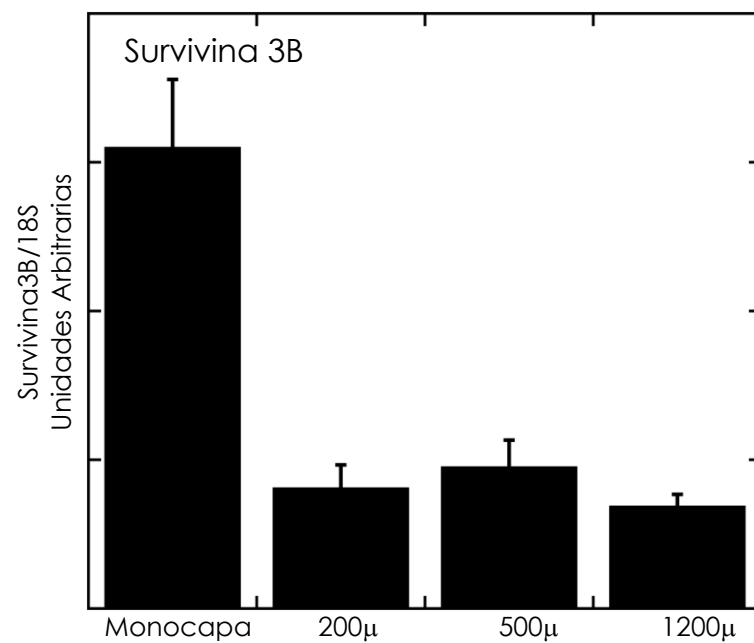
Los niveles totales de la survivina DeltaEx3 fueron similares a aquellos de la survivina total (Figura 8C).

Interesantemente, los niveles basales del cultivo en monocapa de la survivina 3B, fueron dos veces más altos que el resto de las isoformas analizadas y los niveles de expresión de la survivina 3B fueron más bajos en los diferentes tamaños del esferoide que en la monocapa (Figura 8D).

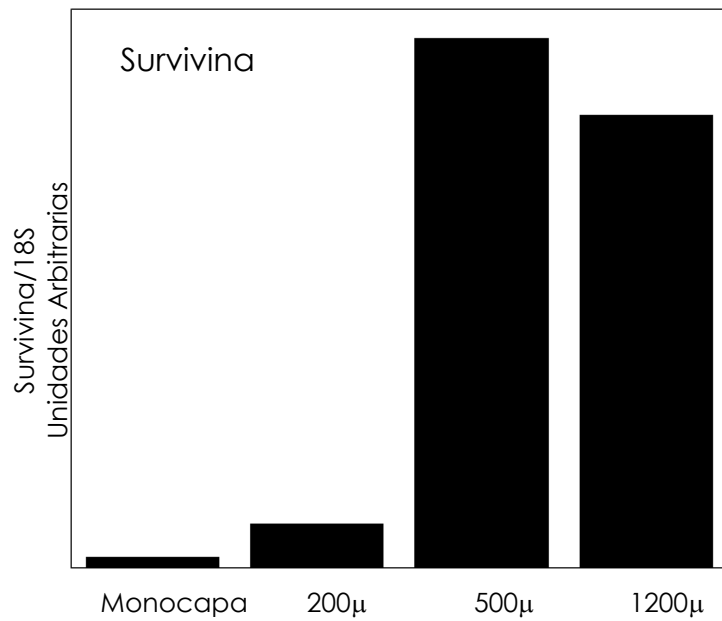
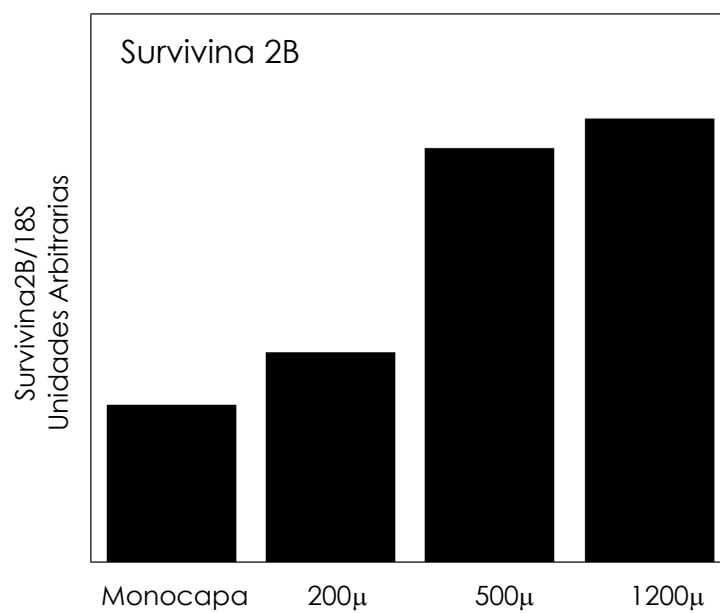
Estos experimentos también los realizamos en la línea celular HEK293. En estas células, los niveles de expresión de las isoformas 2B y 3B de la survivina fueron muy similares a los obtenidos en la línea celular HeLa. (Figura 9B y 9D). Mientras que los niveles de las isoformas tipo y DeltaEx3 se mantuvieron altos durante la última fase de crecimiento del esferoide (Figura 9A y 9C).

**A****B**

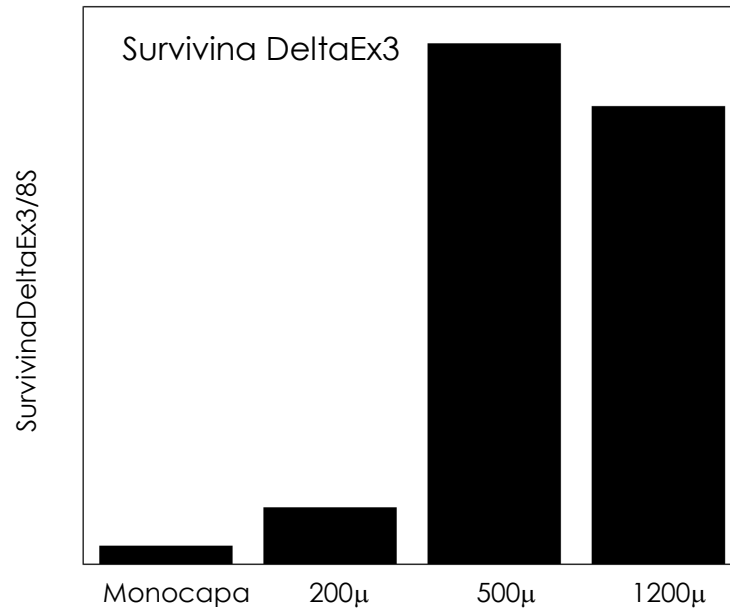
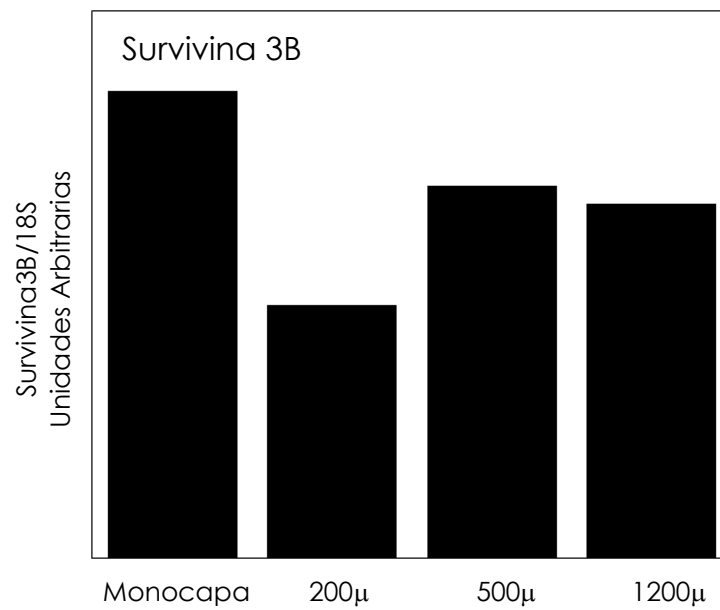
**Figure 8.** Expresión de las isoformas de la survivina en los esferoides. El ARN total se extrajo de esferoides multicelulares de HeLa y de su control de cultivo en monocapa; y se transcribió a ADN complementario. Se utilizaron oligos para las diferentes isoformas de la survivina para evaluar los niveles de expresión por PCR en tiempo real. **A)** Survivina total. **B)** Survivina 2B. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

**C****D**

**Cont. Figura 8.** Expresión de las isoformas de la survivina en los esferoides. El ARN total se extrajo de esferoides multicelulares de HeLa y de su control de cultivo en monocapa; y se transcribió a ADN complementario. Se utilizaron oligos para las diferentes isoformas de la survivina para evaluar los niveles de expresión por PCR en tiempo real. **C)** Survivina DeltaEx3. **D)** Survivina 3B. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

**A****B**

**Figure 9.** Expresión de las isoformas de la survivina en los esferoides. El ARN total se extrajo de esferoides multicelulares de HEK293 y de su control de cultivo en monocapa; y se transcribió a ADN complementario. Se utilizaron oligos para las diferentes isoformas de la survivina para evaluar los niveles de expresión por PCR en tiempo real. **A)** Survivina total. **B)** Survivina 2B. Estos experimentos se realizaron por duplicado.

**C****D**

**Cont. Figura 9.** Expresión de las isoformas de la survivina en los esferoides. El ARN total se extrajo de esferoides multicelulares de HEK293 y de su control de cultivo en monocapa; y se transcribió a ADN complementario. Se utilizaron oligos para las diferentes isoformas de la survivina para evaluar los niveles de expresión por PCR en tiempo real. **C)** Survivina DeltaEx3. **D)** Survivina 3B. Estos experimentos se realizaron por duplicado.

### **Localización de la isoformas de la survivina en el esferoide**

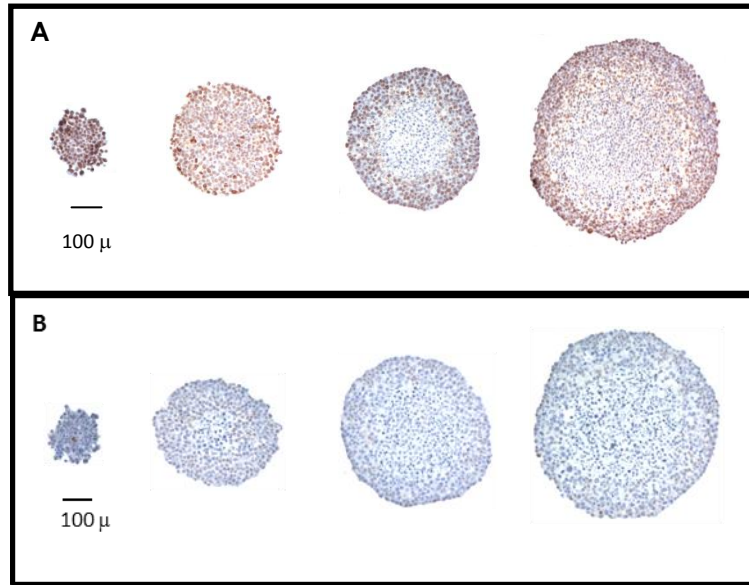
Los MTS presentan una compleja red organizada con interacciones tridimensionales célula-célula y célula-matriz extracelular, por lo que cada célula individual está expuesta a diferentes condiciones de espacio y de disponibilidad de nutrientes. Debido a esto, se crean diferentes poblaciones dentro del esferoide. A nivel estructural se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares en los MTS: un centro apoptótico/necrótico, una capa intermedia de células quiescentes con tendencia a diferenciarse y una capa externa de células en proliferación. El centro necrótico/apoptótico aparece en MTS con diámetro mayor de 500  $\mu\text{m}$ .

Para analizar en qué zona del esferoide se encontraban las variantes de la survivina, realizamos una caracterización de las diferentes poblaciones dentro del esferoide.

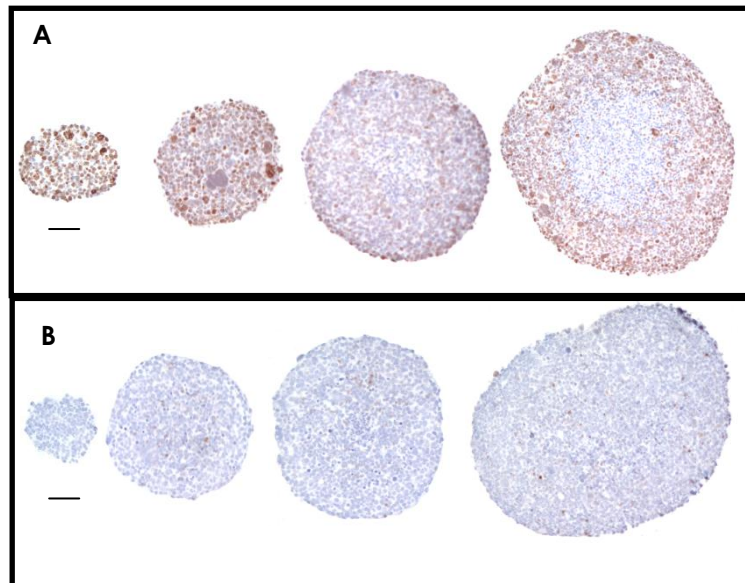
Para caracterizar los cambios proliferativos y quiescentes que ocurren durante el crecimiento de los esferoides, los esferoides de las líneas HeLa y HEK293 se fijaron con formalina y se embebieron en parafina. Posteriormente, los cortes de estos esferoides se tiñeron con el marcador de proliferación Ki-67 y con el marcador de quiescencia p27<sup>KIP1</sup>.

La expresión de los dos marcadores en los esferoides de las dos líneas fue muy similar. Encontramos que el porcentaje de células positivas a Ki67 en los esferoides de HeLa y de HEK293, disminuye conforme el tamaño aumenta y las células que se encontraban en las capas externas de los esferoides frecuentemente eran positivas a Ki-67 (Figuras 10A y 11A).

Las células positivas a p27<sup>KIP</sup> se encontraron en los esferoides más grandes de 25  $\mu\text{m}^3$  (Figuras 10B y 11B), y la proporción de células positivas a p27<sup>KIP</sup> fue similar a la de las zonas intermedia y central (que corresponden al área negativa a Ki-67).



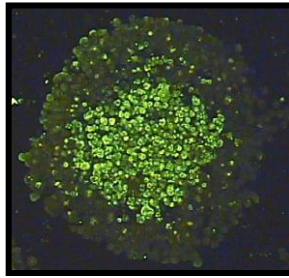
**Figura 10.** Inmunocitoquímica de Ki67 y p27<sup>KIP</sup> en esferoides representativos. Los cortes de esferoides de HeLa teñidos para la expresión de **A)** Ki67 y **B)** p27<sup>KIP</sup>. La línea representa 100 μm.



**Figura 11.** Inmunocitoquímica de Ki67 y p27<sup>KIP</sup> en esferoides representativos. Los cortes de esferoides de HEK293 teñidos para la expresión de **A)** Ki67 y **B)** p27<sup>KIP</sup>. La línea representa 100 μm.

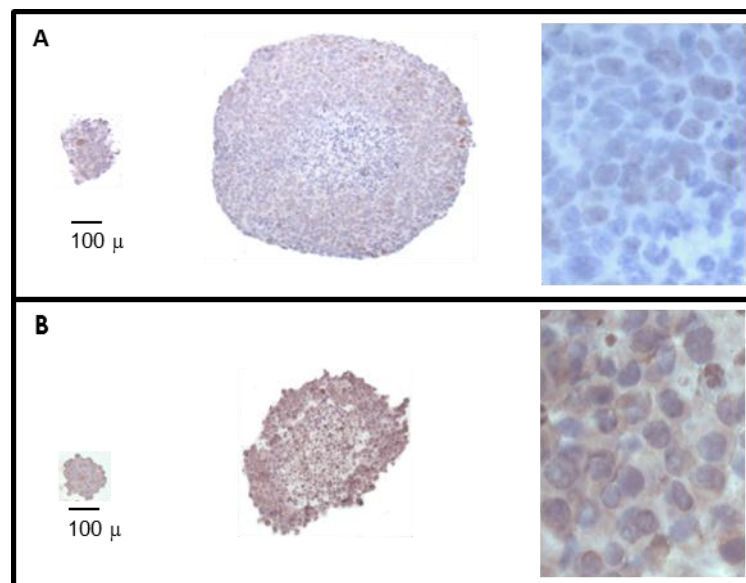


Posteriormente, para determinar la población de las células apoptóticas en el esferoide, realizamos la técnica de TUNEL. En la siguiente figura se puede observar que las células apoptóticas se encuentran en la zona central del esferoide (Figura 12).

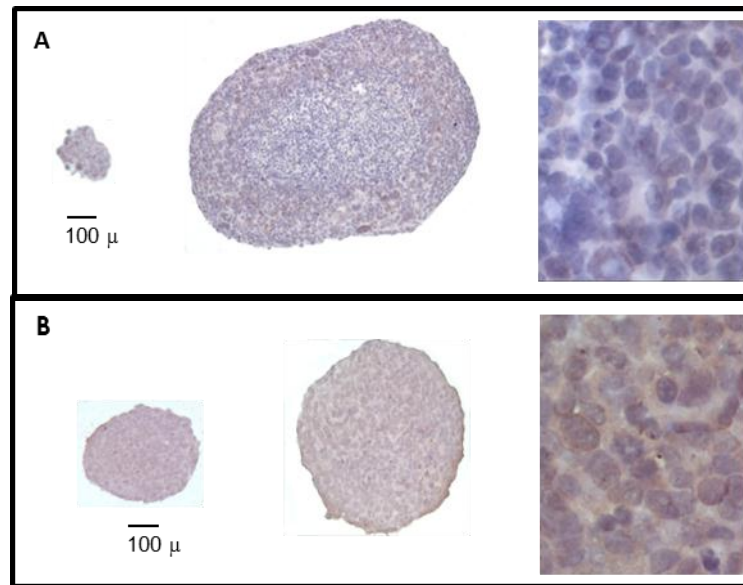


**Figura 12.** Población de células apoptóticas en el esferoide. Se realizó la técnica de TUNEL en un esferoide de la línea celular HeLa.

Finalmente, para observar la distribución de las isoformas de la survivina dentro del esferoide, realizamos inmunocitoquímica de la survivina y de la survivina DeltaEx3 en esferoides HeLa y HEK293 (Figuras 13 y 14).



**Figura 13.** Expresión de la survivina y survivina DeltaEx3 en esferoides. Inmunocitoquímica en esferoides de HeLa **A)** Survivina y **B)** Survivina DeltaEx3. La línea representa 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 14.** Expresión de la survivina y survivina DeltaEx3 en esferoides. Inmunocitoquímica en esferoides de HEK293 **A)** Survivina y **B)** Survivina DeltaEx3. La línea representa 100 μm.

Como se puede observar en las figuras 13 y 14, la tinción de la survivina se encuentra principalmente en las capas proliferativas del esferoide, mientras que la survivina DeltaEx3 es más heterogénea dentro de los esferoides.

No fue posible realizar este ensayo para la survivina 2B, debido a que el anticuerpo no funcionó para inmunocitoquímica y tampoco para la survivina 3B, debido a que no hay anticuerpo disponible para esta isoforma.

### **Resistencia Multicelular**

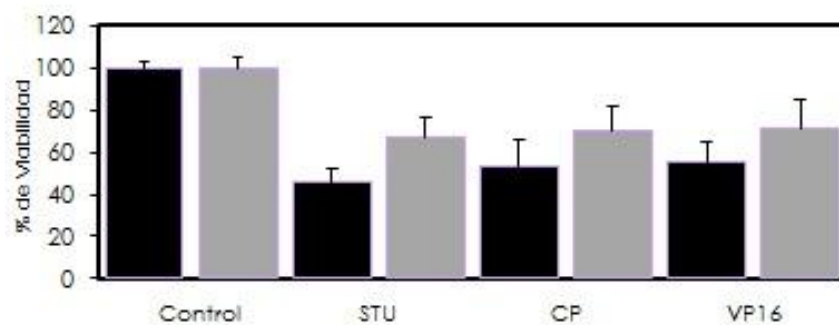
En los tumores sólidos, *in vivo*, las células más resistentes a quimioterapia o radioterapia se ubican a una distancia entre 100 y 150 μm de los vasos sanguíneos y áreas necróticas con reducida concentración de oxígeno. Dentro del esferoide, al aumentar el número de células y compartimentalizarse, se

incrementa también su resistencia al efecto de diversos fármacos, tal y como sucede *in vivo*.

La mayoría de los fármacos citotóxicos convencionales (cisplatino, estaurosporina, taxol) matan a las células (tumorales y no tumorales) que se encuentran proliferando. Debido a la estructura tridimensional del esferoide y del tumor sólido, la concentración final del fármaco, en las capas más profundas o alejadas de los vasos sanguíneos, es tan baja que resulta ineficaz contra las células ya sean quiescentes o no.

Para determinar si nuestros esferoides tienen resistencia a antineoplásicos, se obtuvo la LD50 (dosis letal media) de Staurosporina, Cisplatino y Etopósido. Posteriormente, las células se cultivaron en esferoide, se disgregaron, se cultivaron en monocapa y se observó si se había modificado la LD50, haciendo más resistentes a las células.

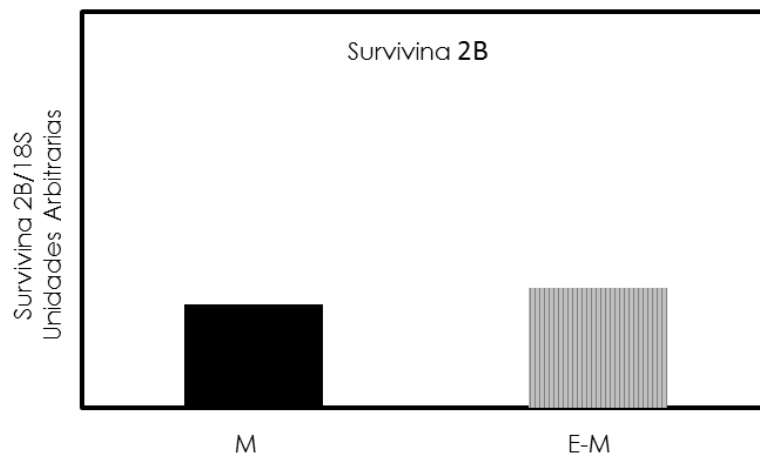
Se determinó la viabilidad y se observó que las células que habían sido cultivadas en esferoide fueron más resistentes a los fármacos, aunque estas diferencias no fueron significativas (Figura 15).



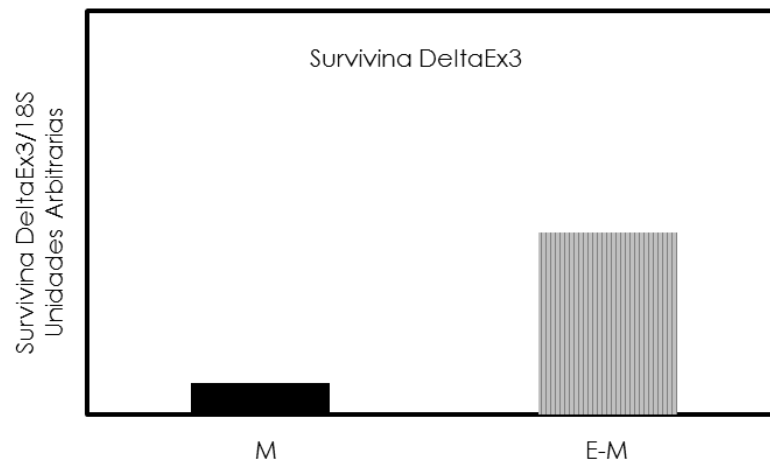
**Figura 15.** Resistencia a los antineoplásicos. Las células HeLa se cultivaron en esferoide hasta llegar al tamaño máximo (1200  $\mu$ ). Posteriormente se disgregaron y se sembraron en monocapa. Se mantuvieron en este cultivo por tres pases y se expusieron a los antineoplásicos, staurosporina (STU), 250 nM por 24 h, cisplatino (CP), 40  $\mu$ M por 18 h y Etopósido (VP16), 100  $\mu$ M por 48 h.

Posteriormente, para saber si los niveles de expresión de las isoformas, en las células que fueron cultivadas previamente en esferoides (después de 3 pasajes), se modificaron, analizamos su expresión por PCR en tiempo real, con las condiciones antes mencionadas (Figura 16).

**A**

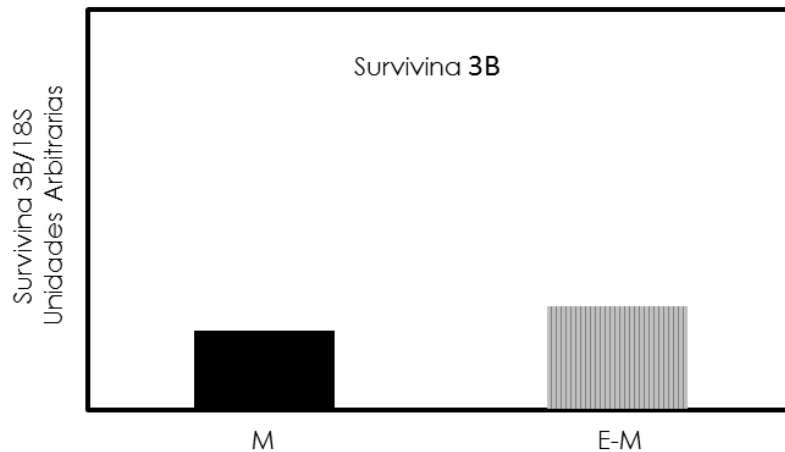


**B**



**Figura 16.** Niveles de expresión de las isoformas de la survivina en células previamente cultivadas en esferoide. Las células HeLa se cultivaron en esferoide, se disgregaron y se sembraron en monocapa, después de tres pasajes se extrajo ARN total y se realizó RT-PCR en tiempo real. M, monocapa; E; esferoide. Se usaron oligos específicos para la amplificación de cada isoforma. **A)** Survivina 2B, **B)** Survivina DeltaEx3 y **C)** Survivina 3B.

C



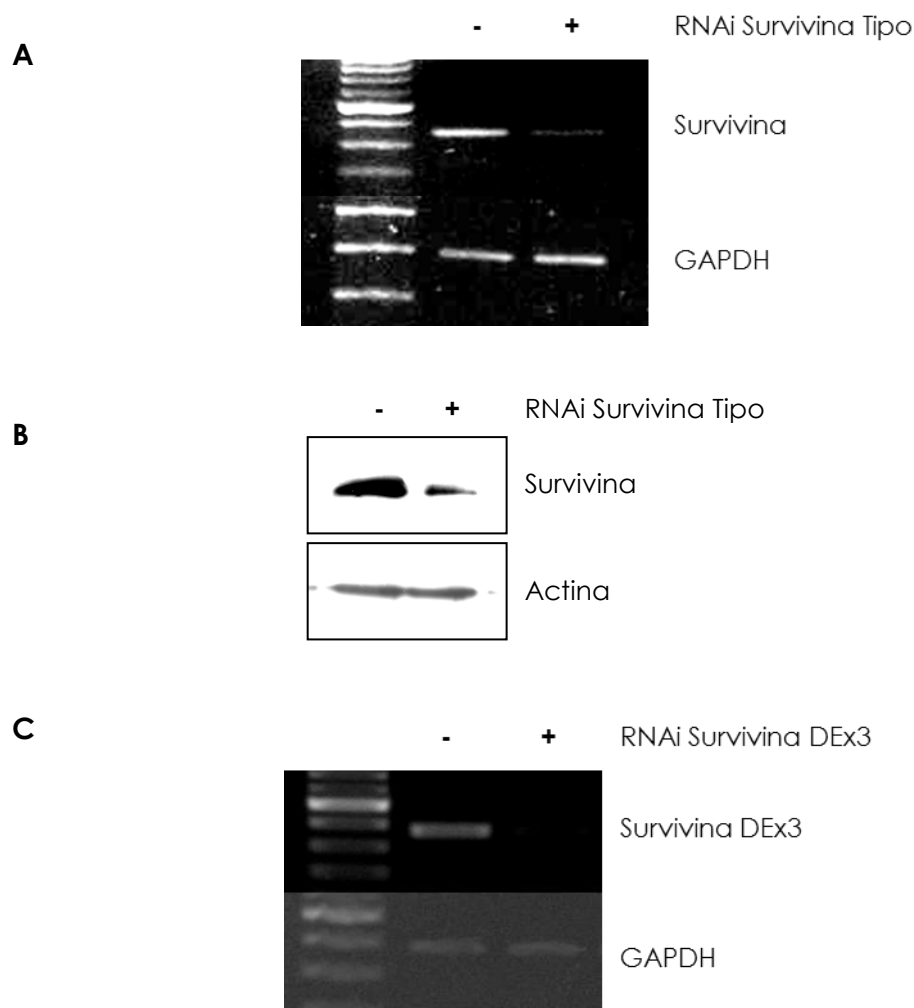
**Cont. Figura 16.** Niveles de expresión de las isoformas de la survivina en células previamente cultivadas en esferoide. Las células HeLa se cultivaron en esferoide, se disgregaron y se sembraron en monocapa, después de tres pasajes se extrajo ARN total y se realizó RT-PCR en tiempo real. M, monocapa; E; esferoide. Se usaron oligos específicos para la amplificación de cada isoforma. **A)** Survivina 2B, **B)** Survivina DeltaEx3 y **C)** Survivina 3B.

Los niveles de expresión de la survivinas 2B y 3B fueron muy similares a los niveles antes obtenidos del cultivo en monocapa, mientras que la expresión de la survivina DeltaEx3 aumentó considerablemente, lo que sugiere un mecanismo epigenético para la regulación de la survivina en un modelo tridimensional.

### ***La inhibición de la survivina DeltaEx3 modifica la sensibilidad de los esferoides a la apoptosis***

Para evaluar la importancia de la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en la formación del esferoide, decidimos inhibir a esta isoforma en las células HeLa. Diseñamos dos ARNs de interferencia, uno dirigido a la survivina tipo y otro para la survivina DeltaEx3.

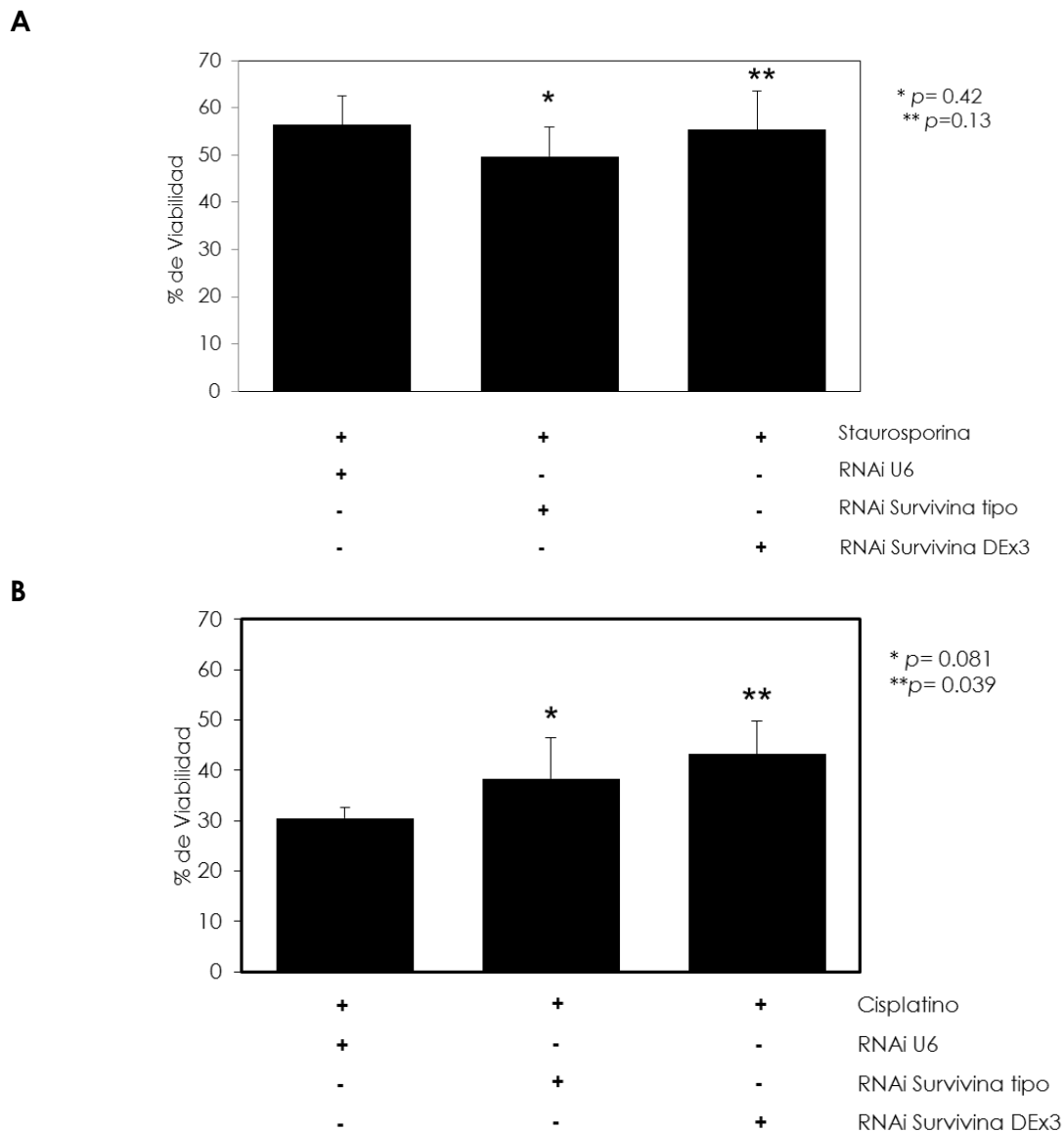
Para evaluar que esta inhibición fuera específica, analizamos la expresión de las diferentes isoformas de la survivina por medio de RT-PCR (Figura 17).



**Figura 17.** Inhibición de la isoformas de la survivina. **A)** RT-PCR semicuantitativo de ARN total de las células HeLa transfectadas con el vector vacío y con el RNAiSurtipo. **B)** Western blot de proteínas totales de las células HeLa transfectadas con el vector vacío y con el RNAiSurtipo. **C)** RT-PCR semicuantitativo de ARN total de las células HeLa transfectadas con el vector vacío y con el RNAiSurDeltaEx3.

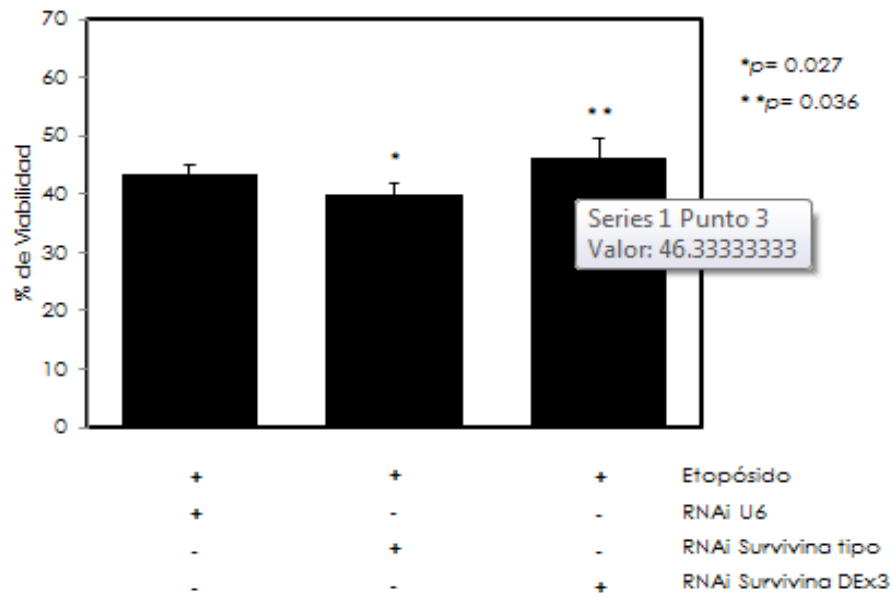
Para determinar si la inhibición de estas isoformas de la survivina hacía sensibles a las células HeLa expuestas a antineoplásicos, las células trasfectadas con los RNAs se expusieron a las LD50 de la estaurosporina, del cisplatino y del etopósido (Figura 18). Al contrario de lo que esperábamos, la viabilidad en las células expuestas con estaurosporina no sufrió cambios considerables, mientras

que las células expuestas al cisplatino, incluso mostraron un ligero aumento en la viabilidad (RNAi Survivina Tipo, figura 18B). De la misma manera, con la exposición al etopósido, las células no se sensibilizaron al inhibir a estas proteínas (Figura 18C).



**Figura 18.** La inhibición de la survivina tipo y de la survivina DelatEx3 modifican la sensibilidad de los esferoides a la apoptosis inducida por antineoplásicos. Las células HeLa transfectadas con el vector vacío (RNAi U6) y con los RNAs de interferencia de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3, se expusieron a diferentes antineoplásicos; **A)** staurosporina, 250 nM por 24 h, **B)** cisplatino, 40  $\mu$ M por 18 h y **C)** Etopósido, 100  $\mu$ M por 48 h. La viabilidad se determinó por cristal violeta. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada estímulo.

C

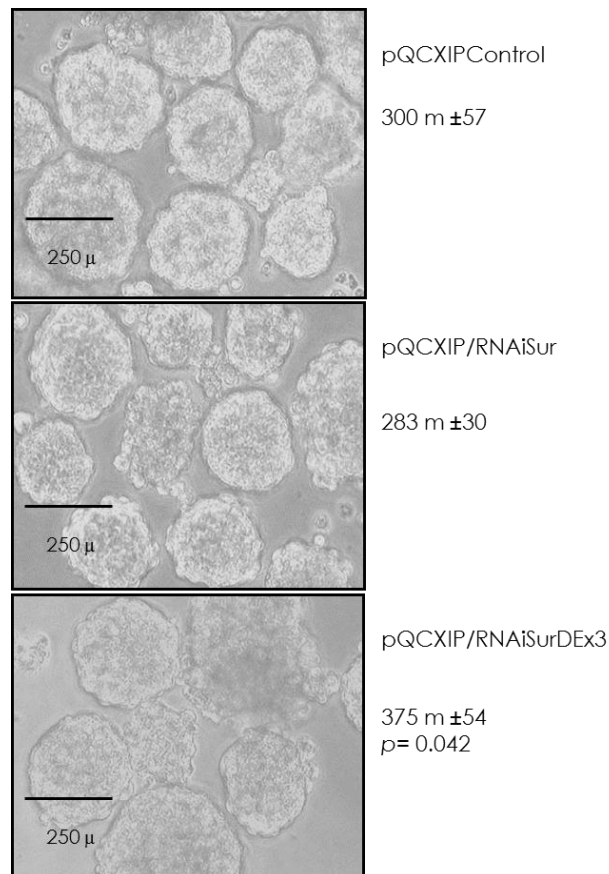


**Cont. Figura 18.** La inhibición de la survivina tipo y de la survivina DelatEx3 modifican la sensibilidad de los esferoides a la apoptosis inducida por antineoplásicos. Las células HeLa transfectadas con el vector vacío (RNAi U6) y con los RNAs de interferencia de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3, se expusieron a diferentes antineoplásicos; **A)** staurosporina, 250 nM por 24 h, **B)** cisplatino, 40  $\mu$ M por 18 h y **C)** Etopósido, 100  $\mu$ M por 48 h. La viabilidad se determinó por cristal violeta. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada estímulo.



### **Efecto de la inhibición de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en el crecimiento de los esferoides**

Para analizar la importancia de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en la formación de esferoides, creamos células HeLa estables con los RNAs de interferencia. Las líneas celulares generadas se cultivaron la técnica de “liquid overlay”, previamente descrita. Los esferoides de la línea con la survivina tipo inhibida no mostraron cambios al compararlos con los esferoides control. A diferencia de éstos, los esferoides con el RNAi/SurDeltaEx3 tuvieron un tamaño mayor (Figura 19).

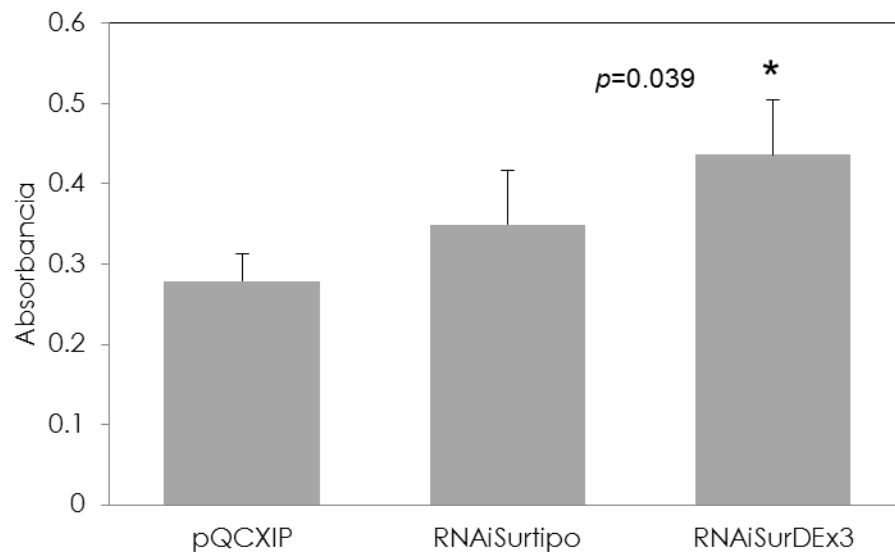


**Figura 19.** Efecto de la inhibición de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en el crecimiento de los esferoides. Las células establemente transfectadas se cultivaron por 3 días y se observaron con el microscopio. Se muestra el promedio de 30 esferoides, de 3 experimentos independientes. La línea representa 250  $\mu$ m.

### **Efecto de la inhibición de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en la clonogenicidad**

El ensayo de clonogenicidad o de formación de colonias, evalúa la supervivencia celular in vitro, basado en la capacidad de algunas células tumorales para proliferar y formar colonias. Este ensayo es utilizado para determinar si las células tumorales retienen o no la capacidad proliferativa después de ser tratadas con radiaciones ionizantes o con agentes citotóxicos.

Realizamos ensayos de clonogenicidad con las líneas celulares estables con los RNAs de interferencia. Como se puede observar en la figura 20, las células con la survivina Delta Ex3 inhibida son más clonogénicas que las células control ( $p=0.039$ ).

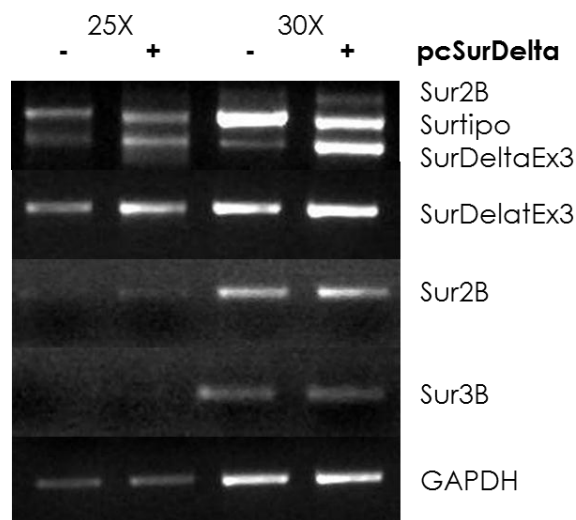


**Figura 20.** Efecto de la inhibición de la survivina tipo y de la survivina DeltaEx3 en la clonogenicidad. Las células establemente transfectadas se sembraron por 12 días en diferentes diluciones.

Con estos resultados, en donde la inhibición de la survivina DeltaEx3 hace más sensibles a las células expuestas al etopósido, hace que las células formen esferoides más grandes y que sean más clonogénicas, decidimos sobreexpresar a esta isoforma y analizar algunos de los procesos previos.

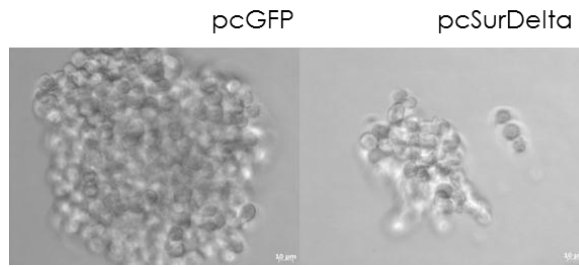
## **La sobreexpresión de la Survivina DeltaEx3 Inhibe la Formación del Esferoide, el Crecimiento Celular y la Clonogenicidad**

Para evaluar la importancia de la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en la formación del esferoide, decidimos sobreexpresar a esta isoforma en las células HeLa. Para evaluar que esta sobreexpresión fuera específica, analizamos la expresión de las diferentes isoformas de la survivina por medio de RT-PCR. Encontramos que solamente la survivina DeltaEx3 estaba sobreexpresada (Figura 21).



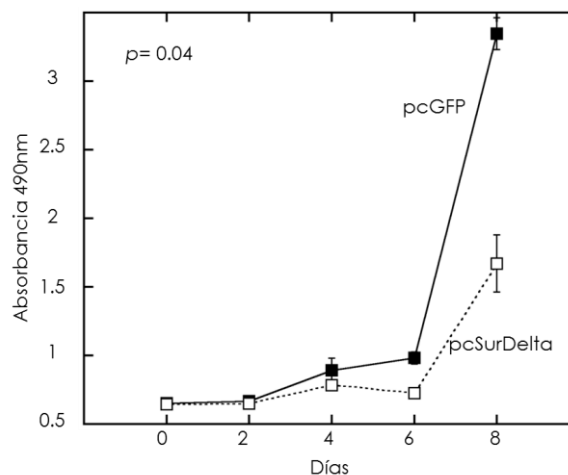
**Figura 21.** Sobreexpresión de la survivina DeltaEx3. Las células HeLa se transfectaron establemente con el vector pcSurDeltaEx3 y se extrajo ARN total. Los niveles de las diferentes isoformas se analizaron por PCR semicuantitativo. La expresión se normalizó con GAPDH.

Cultivamos esferoides tumorales con las células pcSurDeltaEx3 y como se muestra en la figura 22, las células que sobreexpresan a la survivina DeltaEx3 no forman esferoides, las células solamente son capaces de agregarse en pequeños grupos.



**Figura 22.** Efecto de la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en el crecimiento de los esferoides. Las células pcGFP y pcSurDelta se cultivaron por 3 días y se observaron al microscopio.

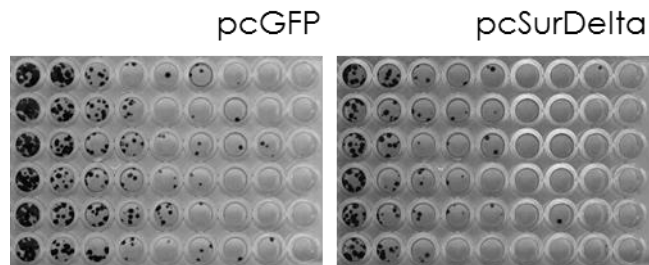
Desarrollamos ensayos de proliferación para investigar las posibles razones de la agregación. Inesperadamente, encontramos que la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 inhibe el crecimiento celular (Figura 23).



**Figura 23.** Efecto de la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en la proliferación. Las células pcGFP y pcSurDelta se cultivaron por 8 días y realizó la técnica de cristal violeta. La absorbancia se leyó a 490 nm. El experimento se realizó por triplicado.

Finalmente, debido a que la formación del esferoide depende, no solamente de la habilidad de las células para proliferar, sino también de la capacidad de sobrevivir como clona, decidimos realizar ensayos de clonogenicidad. Como se puede observar en la figura 24, las células que sobreexpresan a la survivina DeltaEx3 fueron menos clonogénicas al compararlas con las células control, lo cual concuerda con el aumento de clonogenicidad al inhibir a esta isoforma (Figura 20). Por lo tanto, la

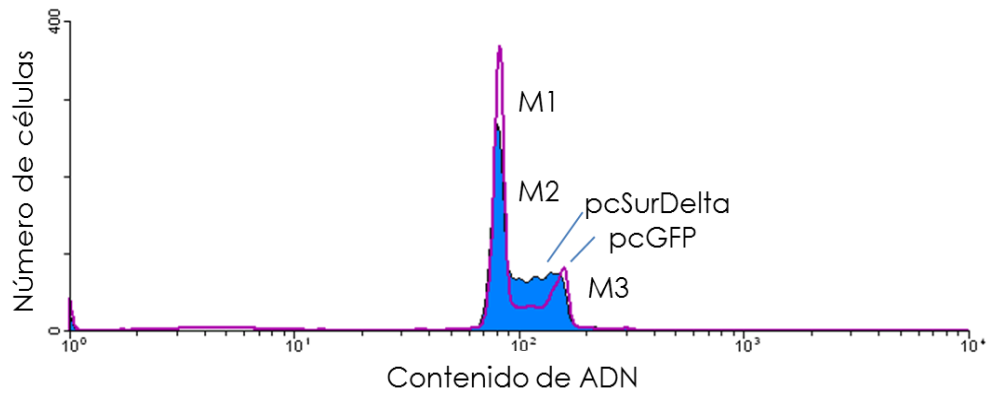
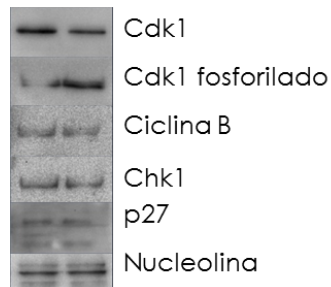
sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 afecta la capacidad clonogénica y la proliferación celular en las células de cáncer cérvicouterino.



**Figura 24.** Efecto de la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en la clonogenicidad. Las células establemente transfectadas se sembraron por 12 días en diferentes diluciones. Se tiñeron con cristal violeta.

#### ***Efectos de la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en el ciclo celular***

Debido a nuestros resultados, en los que la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 inhibe el crecimiento celular, decidimos investigar la distribución del ciclo celular después de sobreexpresar a esta isoforma. Los análisis de citometría de flujo revelaron que la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 disminuye un poco la población celular que se encuentra en la fase S del ciclo (5% en las células transfectadas con pcSurDelta versus 6.7% en las células transfectadas con pcGFP) (Figura 25A). Posteriormente, quisimos observar si había algún cambio en las proteínas involucradas en este proceso y analizamos la expresión de Cdk1, Ciclina B, Chk, p27 y el estado de fosforilación de Cdk1 (Figura 25B). Los niveles de proteína de Cdk1, Ciclina B, Chk1 y p27 no sufrieron algún cambio al sobreexpresar a la survivina DeltaEx3, solamente encontramos un incremento en los niveles de Cdk1 fosforilado.

**A****B**

**Figura 25.** Evaluación del ciclo celular en las células que sobreexpresan a la survivina DeltaEx3. **A)** La distribución del ciclo celular de las poblaciones sobreexpresando a la survivina DeltaEx3 o GFP, se evaluaron por citometría de flujo. M1, G0/G1; M2, fase S, M3, G2/M. El experimento se realizó por triplicado. **B)** La expresión de las proteínas del ciclo celular se analizó por western blot con proteínas nucleares de las células establemente transfectadas, la expresión de nucleolina se utilizó como control de carga.

## Discusión

---

La apoptosis o muerte celular programada es el proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra o intracelulares. La apoptosis es fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas, en el mantenimiento de la homeostasis del número de células y en la defensa frente a patógenos. Es un proceso finamente regulado que cuando se altera produce graves patologías como malformaciones, defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas o aparición de tumores.

La inhibición aberrante de este programa de muerte celular juega un importante rol en promover el crecimiento celular del cáncer [2]. La survivina está sobreexpresada en la mayoría de todos los tumores, incluyendo el de pulmón, de colon, de mama, pancreático, gástrico, de hígado, cérvicouterino, de ovario y de próstata, así como también en melanomas y enfermedades hematopoyéticas [27,76,96,97]. La survivina y sus isoformas han sido implicadas en varios procesos celulares, incluyendo la apoptosis y la proliferación. Debido al splicing alternativo, por lo menos cinco isoformas de la survivina están presentes en las células de cáncer (survivina, survivina 2B, survivina 3B, survivina Delta Ex3 y survivina 2 alfa). Sin embargo, los papeles exactos de las isoformas descritas son desconocidos. Mahotka y colaboradores describieron a la survivina y a la survivina DeltaEx3 como proteínas antiapoptóticas, en contraste con las otras isoformas [42]. La survivina DeltaEx3 es la única isoforma que tiene una señal de localización mitocondrial y un dominio BH2 [38]. Además, se ha observado que el pool de survivina mitocondrial protege a las células de la muerte celular inducida por varios agentes [56].

En este proyecto, analizamos a las isoformas de la survivina en la progresión del cáncer utilizando un modelo que asemeja más la situación de un tumor *in vivo* que el cultivo de monocapa. Por lo tanto, los esferoides constituyen una buena herramienta experimental que hace la unión entre los cultivos de monocapa y los modelos experimentales de animales. Las células tumorales mantenidas en cultivos con movimiento pueden formar agregados con forma

de esfera, llamados "esferoides multicelulares". Estos esferoides multicelulares se parecen en algunas propiedades a los tumores sólidos, como por ejemplo en el arreglo de la matrix extracelular, las zonulas oclusivas entre las células epiteliales, los gradientes de nutrientes y la proliferación celular de la periferia del esferoide hacia el centro [98]. Como se observa en los tumores, los esferoides en crecimiento gradualmente generan subpoblaciones de células apoptóticas y quiescentes en el centro. De la misma manera, en las regiones del tumor en donde no hay una adecuada vasculatura, esta subpoblación de células quiescentes constituye una masa hipóxica de células no proliferantes que son resistentes a varias terapias [99]. Usando este modelo, nosotros encontramos que las isoformas de la survivina fueron diferencialmente reguladas durante el crecimiento de los esferoides.

La expresión de la survivina y de la survivina DeltaEx3, aumentan durante la fase exponencial del esferoide para y en el tamaño máximo del esferoide mostraron un ligero decremento. El aumento de la isoforma Delta Ex3 se esperaba, debido a que esta isoforma se asemeja más a la survivina tipo y como ha sido reportado, se encuentran mayores niveles en las fases del ciclo celular, G1 tardía, S, G2 y M. La disminución de la expresión de estas proteínas en los esferoides de mayor tamaño, probablemente se deba que en esta fase la población de células proliferantes disminuye en el esferoide y como se pudo observar en las inmunocitoquímicas de estas proteínas, se encontraban principalmente en las zonas proliferativas del esferoide. Aunque hasta la fecha, no se ha reportado que la survivina DeltaEx3 esté relacionada con la proliferación del tumor [47].

La survivina 2B aumenta considerablemente durante el crecimiento del esferoide, llegando a su máxima expresión en los esferoides de mayor tamaño. Se ha reportado que esta isoforma es una proteína proapoptótica y antagonista de la survivina tipo [42,46], posiblemente su aumento en los esferoides se deba a que existe una regulación entre las isoformas y que se formen heterodímeros con la survivina tipo, inactivando de esta manera al dímero.



En cuanto a la survivina 3B, interesantemente sus niveles de expresión fueron muy altos en el cultivo en monocapa, para posteriormente disminuir durante el crecimiento del esferoide. Actualmente, no se ha reportado mucho de esta isoforma. Se sabe que tiene una señal de localización nucleolar y que interactúa con las proteínas del complejo pasajero cromosomal, pero aún no se ha reportado el papel que pudiera desempeñar en el crecimiento tumoral. Lamentablemente, no pudimos analizar la localización de esta proteína en las poblaciones del esferoide, estos datos podrían ayudar a esclarecer su papel en algunos procesos celulares.

Dentro del esferoide, al aumentar el número de células y compartimentalizarse, se incrementa también su resistencia al efecto de diversos fármacos, tal y como sucede *in vivo*. Esto se conoce como resistencia multicelular. Se han descrito dos tipos: la resistencia adquirida y la resistencia intrínseca o inherente a la estructura del esferoide. La resistencia adquirida es generada por diversos factores relacionados con la hipoxia y asociados con el crecimiento tridimensional. La segunda, es la resistencia intrínseca que desarrolla el tumor desde su origen [100].

Para determinar si las células cultivadas en esferoide, permanecían con esta resistencia multicelular, obtuvimos la LD50 de la Staurosporina, del Cisplatino y del Etopósido. Posteriormente, las células se cultivaron en esferoide, se disgregaron, se cultivaron en monocapa y se observó si se había modificado la LD50, haciendo más resistentes a las células.

Se podría decir que la resistencia en nuestras células se mantuvo. En general, hubo una tendencia al aumento de la viabilidad al exponerse a los fármacos y al compararse con las células control, aunque estos cambios no fueron significativos.

Quisimos analizar qué pasaba con la expresión de las isoformas de la survivina en este tipo de células, que ya habían sido cultivadas en un modelo tridimensional y que tenían mayor resistencia a los fármacos. Nuevamente, cultivamos a las células en esferoide, disgregamos y sembramos en monocapa.

Después de tres pasajes, analizamos la expresión de las variantes de la survivina.

Los niveles de expresión de la survivinas 2B y 3B fueron muy similares a los niveles antes obtenidos del cultivo en monocapa, mientras que la expresión de la survivina DeltaEx aumentó considerablemente, lo que sugiere un mecanismo epigenético para la regulación de la survivina en un modelo tridimensional.

Para determinar si la inhibición de alguna de las diferentes isoformas de survivina, modificaba la sensibilidad de los esferoides a la apoptosis inducida por antineoplásicos, diseñamos RNAs de interferencia dirigidos contra la survivina tipo y la survivina DeltaEx3. Decidimos enfocarnos a estas isoformas debido que están diferencialmente desreguladas durante el crecimiento de los esferoides.

Las células con las isoformas inhibidas se expusieron a las LD50 de los antineoplásicos mencionados anteriormente. Se ha reportado que las variantes tipo y DeltaEx3 son proteínas antiapoptóticas y su sobreexpresión en los cánceres se ha relacionado con un mal pronóstico. Es por esto que al inhibir a las isoformas, lo más probable es que hubiera un aumento en la sensibilidad a estos fármacos y que las células fueran menos viables, pero en ningún experimento encontramos mayor sensibilidad a los estímulos expuestos y esto probablemente se deba a una sustitución de papeles con estas isoformas, ya que los RNAs utilizados en este proyecto son específicos para la survivina tipo o para la survivina DeltaEx3.

Finalmente, para determinar si la inhibición específica de estas isoformas modificaba la cinética de crecimiento del esferoide, cultivamos esferoides con las células establemente transfectadas y realizamos ensayos de clonogenicidad.

Los esferoides con la survivina DeltaEx3 inhibida crecieron más rápidamente y las células fueron más clonogénicas, mientras que en los esferoides con el RNAi de la survivina tipo, no hubo cambios significativos. Por lo que decidimos sobreexpresar a la proteína survivina DeltaEx3 para corroborar algunos resultados y ayudarnos a esclarecer el papel que esta isoforma estaba

desempeñando en el crecimiento del esferoide. Para ésto, sobreexpresamos a esta variante de la survivina y realizamos ensayos para analizar procesos importantes en el crecimiento del esferoide, como proliferación, clonogenicidad y el ciclo celular.

Las células con la survivina DeltaEx3 sobreexpresada (pcSurDelta), y las usamos para cultivar esferoides. Interesantemente, las células no fueron capaces de formar estructuras propias de un esferoide y solamente se formaron algunos pequeños agregados.

Posteriormente, analizamos si esta sobreexpresión modificaba la proliferación y la clonogenicidad de las células, ya que son procesos involucrados en el crecimiento y remodelaje del esferoide.

Nuestros resultados muestran que el crecimiento celular se inhibió 2.25 veces y también se redujo la capacidad clonogénica, lo cual concuerda con el aumento de la clonogenicidad en las células con la survivina DeltaEx3 inhibida.

Cabe mencionar que resultados previos de Noton y col., [47], demostraron que, en contraste a nuestros resultados, la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en las células de osteosarcoma U2OS, no causaba un alteración en la proliferación celular, ni en los defectos del ciclo celular.

Esta diferencia se puede deber a un efecto específico de tejido del transgén, ya que nosotros utilizamos una línea de cáncer cérvicouterino para nuestros experimentos.

Además, no hay estudios que sugieran la participación de la survivina DeltaEx3 en la progression del osteosarcoma, en donde la sobreexpresión de esta isoforma ha sido solamente reportada en estadios avanzados del tumor [76]. Estos escenarios de la survivina Delta Ex3 en diferentes tipos de cáncer, necesitan más investigación.

Una posible explicación para nuestros resultados es el efecto potencial de dominante negativo de la isoforma sobreexpresada. Se ha mostrado que las isoformas de la survivina pueden interactuar directa o indirectamente entre ellas [38,72,101]. Estos heterodímeros se han detectado en nuevas localizaciones celulares, lo que podría darles la capacidad de desarrollar

nuevas funciones [38]. Esto también está apoyado por un reporte previo en donde la sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 no puede complementar la pérdida de la capacidad proliferativa, debido a la deficiencia de la survivina [47].

Nuestros datos se asemejan a resultados obtenidos con una mutante de la survivina pseudo-fosforilada [102]. La fosforilación de la survivina en la Thr34 por la cinasa mitótica Cdk1 es requerida para mantener la estabilidad de la survivina, y la inhibición de esta fosforilación resulta en un incremento en la sensibilidad a los estímulos apoptóticos y a la muerte celular mediada por casapasas, sugiriendo una relación entre la apoptosis y el ciclo celular [55,103]. La mutación de la Thr34 con una alanina no fosforilable, disminuye su estabilidad y suprime su actividad citoprotectiva [55,103]. Barret y col., [102] reportaron que la mutación, fosfo-mimética, Thr34E, permite el crecimiento e incrementa la resistencia a la muerte inducida por varios estímulos.

Definitivamente, se requieren estudios adicionales para describir el papel de la survivina y de sus isoformas en la proliferación. Además, recientemente se han descubierto nuevos roles fisiológicos y patológicos, incluida la angiogénesis, mantenimiento de células stem y resistencia a las drogas [104], haciendo de esta proteína un interesante blanco para la intervención terapéutica. Varios estudios han demostrado que el silenciamiento de la survivina previene el crecimiento del tumor en algunos tipos de cáncer [105-108].

## **CONCLUSIONES**

---

En conclusión, con este estudio proporcionamos evidencia de que las isoformas de la survivina se regulan diferencialmente en el esferoide. Más específicamente la survivina DeltaEx3.

Presentamos evidencia de que la survivina DeltaEx3 tiene funciones pro y anticáncer.

Demostramos que la expresión ectópica de la survivina DeltaEx3 reduce la proliferación, la clonogenicidad y la capacidad de crecimiento en un cultivo tridimensional, todos estos importantes procesos para el desarrollo del cáncer.

Estos resultados añaden complejidad al rol de este gen en la progresión del tumor.

## Bibliografía

---

1. Hanahan D, Weinberg RA (2000) *The hallmarks of cancer*. *Cell* 100: 57-70.
2. Thompson CB (1995) *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. *Science* 267: 1456-1462.
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *British journal of cancer* 26: 239-257.
4. Maldonado V, Melendez J, Gonzalez H, Ortega A (1995) *Internucleosomal DNA cleavage in HeLa cells exposed to cisplatin*. *Biochemistry and molecular biology international* 37: 691-696.
5. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE (1998) *The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer*. *Oncogene* 17: 3247-3259.
6. Bandala E, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J (2001) *Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine*. *Biochemical pharmacology* 62: 13-19.
7. Salvesen GS, Dixit VM (1999) *Caspase activation: the induced-proximity model*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 10964-10967.
8. Bridgham JT, Wilder JA, Hollocher H, Johnson AL (2003) *All in the family: evolutionary and functional relationships among death receptors*. *Cell Death Differ* 10: 19-25.
9. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. *Cell* 94: 481-490.
10. Chandra D, Choy G, Deng X, Bhatia B, Daniel P, et al. (2004) *Association of active caspase 8 with the mitochondrial membrane during apoptosis: potential roles in cleaving BAP31 and caspase 3 and mediating mitochondrion-endoplasmic reticulum cross talk in etoposide-induced cell death*. *Mol Cell Biol* 24: 6592-6607.
11. Salvesen GS (2002) *Caspases and apoptosis*. *Essays in biochemistry* 38: 9-19.
12. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001) *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis*. *Mol Cell Biol* 21: 8247-8254.
13. Golks A, Brenner D, Fritsch C, Krammer PH, Lavrik IN (2005) *c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis*. *J Biol Chem* 280: 14507-14513.
14. McDonald ER, 3rd, El-Deiry WS (2004) *Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6170-6175.
15. Cohen GM (1997) *Caspases: the executioners of apoptosis*. *The Biochemical journal* 326 ( Pt 1): 1-16.
16. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, et al. (2002) *The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet*. *Cell Death Differ* 9: 1031-1042.
17. Deveraux QL, Reed JC (1999) *IAP family proteins--suppressors of apoptosis*. *Genes & development* 13: 239-252.
18. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL (2001) *Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs*. *Genome biology* 2: REVIEWS3009.
19. Shi Y (2002) *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. *Molecular cell* 9: 459-470.
20. Vaux DL, Silke J (2005) *IAPs, RINGs and ubiquitylation*. *Nature reviews Molecular cell biology* 6: 287-297.

21. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269: 1424-1427.
22. Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
23. Richter BW, Mir SS, Eiben LJ, Lewis J, Reffey SB, et al. (2001) Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol* 21: 4292-4301.
24. Qiu XB, Goldberg AL (2005) The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. *J Biol Chem* 280: 174-182.
25. Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S (1998) A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* 141: 1415-1422.
26. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, et al. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research* 58: 5315-5320.
27. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine* 3: 917-921.
28. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, et al. (1998) Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *The American journal of pathology* 152: 43-49.
29. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, et al. (2001) An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 40: 1117-1123.
30. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, et al. (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *The EMBO journal* 22: 2729-2740.
31. Altieri DC (2003) Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Progress in cell cycle research* 5: 447-452.
32. Altieri DC (2004) Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *Journal of cellular biochemistry* 92: 656-663.
33. Li F, Altieri DC (1999) Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *The Biochemical journal* 344 Pt 2: 305-311.
34. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, et al. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396: 580-584.
35. Allen SM, Florell SR, Hanks AN, Alexander A, Diedrich MJ, et al. (2003) Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. *Cancer research* 63: 567-572.
36. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC (2002) A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2: 43-54.
37. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR (2000) The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113 Pt 23: 4363-4371.
38. Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, et al. (2005) Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 24: 1994-2007.
39. Kallio MJ, Nieminen M, Eriksson JE (2001) Human inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit. *FASEB J* 15: 2721-2723.
40. Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, et al. (2002) Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell* 13: 3064-3077.

41. Vagnarelli P, Earnshaw WC (2004) *Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. Chromosoma 113: 211-222.*
42. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD (1999) *Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer research 59: 6097-6102.*
43. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, et al. (2004) *Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. Biochemical and biophysical research communications 314: 902-907.*
44. Caldas H, Honsey LE, Altura RA (2005) *Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. Molecular cancer 4: 11.*
45. Caldas H, Honsey LE, Altura RA (2005) *Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. Mol Cancer 4: 11.*
46. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, et al. (2002) *Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. Cell death and differentiation 9: 1334-1342.*
47. Noton EA, Colnaghi R, Tate S, Starck C, Carvalho A, et al. (2006) *Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. The Journal of biological chemistry 281: 1286-1295.*
48. Song Z, Wu M (2005) *Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in Survivin-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation. Oncogene 24: 2723-2734.*
49. Altieri DC (2003) *Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. Oncogene 22: 8581-8589.*
50. Wang HW, Sharp TV, Koumi A, Koentges G, Boshoff C (2002) *Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. EMBO J 21: 2602-2615.*
51. Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N (2004) *Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. Cancer Lett 216: 147-155.*
52. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, et al. (2002) *Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. International journal of cancer Journal international du cancer 100: 30-36.*
53. Knauer SK, Bier C, Schlag P, Fritzmann J, Dietmaier W, et al. (2007) *The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. Cell Cycle 6: 1502-1509.*
54. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, et al. (2002) *Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. J Cell Sci 115: 575-585.*
55. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, et al. (2000) *Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 13103-13107.*
56. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC (2004) *Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. The Journal of clinical investigation 114: 1117-1127.*
57. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, et al. (2001) *Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. Cancer Lett 163: 109-116.*
58. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, et al. (2003) *Prognostic importance of survivin in breast cancer. Br J Cancer 88: 1077-1083.*



59. Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky D, Shroyer AL, et al. (2002) Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10: 134-138.
60. Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR (2003) Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *Eur J Surg Oncol* 29: 379-382.
61. Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, et al. (2003) Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 88: 115-119.
62. Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marce S, et al. (2004) Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 164: 501-510.
63. Shinohara ET, Hallahan DE, Lu B (2004) The Use of Antisense Oligonucleotides in Evaluating Survivin as a Therapeutic Target for Radiation Sensitization in Lung Cancer. *Biol Proced Online* 6: 250-256.
64. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, et al. (2000) Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 96: 1921-1925.
65. Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ (2001) Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 8: 305-310.
66. Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, Wen J, Davidoff A, et al. (2001) The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 36: 1785-1791.
67. Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N (2002) Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 7: 23-29.
68. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, et al. (1998) Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5071-5074.
69. Ku JH, Kwak C, Lee HS, Park HK, Lee E, et al. (2004) Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 171: 631-635.
70. Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, et al. (2002) Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 21: 315-320.
71. Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, Bouvier AM, Plenchette S, et al. (2005) Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 504-510.
72. Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A (2000) Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Medical and pediatric oncology* 35: 550-553.
73. Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, Kajimoto Y, Dohi T, et al. (2003) Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg* 99: 738-745.
74. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, et al. (2002) Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *British journal of cancer* 86: 737-743.
75. O'Driscoll L, Linehan R, S MK, Cronin D, Purcell R, et al. (2003) Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNAs in breast cancer. *Cancer Lett* 201: 225-236.

76. Espinosa M, Cantu D, Herrera N, Lopez CM, De la Garza JG, et al. (2006) *Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer. BMC cancer 6: 45.*
77. Okamura K, Koike H, Sekine Y, Matsui H, Suzuki K (2009) *Survivin and its spliced isoform gene expression is associated with proliferation of renal cancer cells and clinical stage of renal cancer. Cancer Epidemiol 33: 137-141.*
78. Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, et al. (2000) *High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. Oncogene 19: 617-623.*
79. Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, Tomonaga M, Sugahara K, et al. (2001) *Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. Br J Haematol 114: 63-69.*
80. Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, et al. (2002) *Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. Br J Cancer 87: 91-97.*
81. Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, et al. (2003) *Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. Ann Oncol 14: 85-90.*
82. Wuttig D, Kunze D, Fuessel S, Toma M, Stade J, et al. (2007) *Are overexpressed alternative survivin transcripts in human bladder cancer suitable targets for siRNA-mediated in vitro inhibition? Int J Oncol 30: 1317-1324.*
83. Yang XY, Wang MW, Wang GS, You WD (2003) *[Expression of human anti-apoptotic gene survivin and its splice in normal human gastric tissue and gastric cancer]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 20: 75-76.*
84. Ryan B, O'Donovan N, Browne B, O'Shea C, Crown J, et al. (2005) *Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer. Br J Cancer 92: 120-124.*
85. Ferrandina G, Legge F, Martinelli E, Ranelletti FO, Zannoni GF, et al. (2005) *Survivin expression in ovarian cancer and its correlation with clinico-pathological, surgical and apoptosis-related parameters. Br J Cancer 92: 271-277.*
86. Fangusaro JR, Jiang Y, Holloway MP, Caldas H, Singh V, et al. (2005) *Survivin, Survivin-2B, and Survivin-deItaEx3 expression in medulloblastoma: biologic markers of tumour morphology and clinical outcome. British journal of cancer 92: 359-365.*
87. Suga K, Yamamoto T, Yamada Y, Miyatake S, Nakagawa T, et al. (2005) *Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas. Oncol Rep 13: 891-897.*
88. Taubert H, Kappler M, Bache M, Bartel F, Kohler T, et al. (2005) *Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients. Oncogene 24: 5258-5261.*
89. Fangusaro JR, Caldas H, Jiang Y, Altura RA (2006) *Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer. Pediatr Blood Cancer 47: 4-13.*
90. Marconi A, Dallaglio K, Lotti R, Vaschieri C, Truzzi F, et al. (2007) *Survivin identifies keratinocyte stem cells and is downregulated by anti-beta1 integrin during anoikis. Stem Cells 25: 149-155.*
91. Troger A, Siepermann M, Mahotka C, Wethkamp N, Bulle H, et al. (2007) *Role of survivin splice variants in pediatric acute precursor B lymphoblastic leukemia. Klin Padiatr 219: 127-133.*
92. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR (1971) *Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J Natl Cancer Inst 46: 113-120.*
93. Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998) *Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. Int J Exp Pathol 79: 1-23.*

94. Mueller-Klieser W (1997) *Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications*. *Am J Physiol* 273: C1109-1123.
95. Yuhas JM, Tarleton AE, Molzen KB (1978) *Multicellular tumor spheroid formation by breast cancer cells isolated from different sites*. *Cancer research* 38: 2486-2491.
96. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC (1999) *Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma*. *The Journal of investigative dermatology* 113: 1076-1081.
97. Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, et al. (2000) *Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia*. *British journal of haematology* 111: 196-203.
98. Sutherland RM (1988) *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. *Science* 240: 177-184.
99. Brown JM, Giaccia AJ (1998) *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy*. *Cancer research* 58: 1408-1416.
100. Desoize B, Jardillier J (2000) *Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?* *Crit Rev Oncol Hematol* 36: 193-207.
101. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, et al. (2000) *Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement*. *Nature structural biology* 7: 602-608.
102. Barrett RM, Osborne TP, Wheatley SP (2009) *Phosphorylation of survivin at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity*. *Cell cycle* 8: 278-283.
103. Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC (2003) *Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis*. *Cancer research* 63: 230-235.
104. Altieri DC (2008) *Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery*. *Nature reviews Cancer* 8: 61-70.
105. Trabulo S, Cardoso AM, Santos-Ferreira T, Cardoso AL, Simoes S, et al. (2011) *Survivin silencing as a promising strategy to enhance the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents*. *Molecular pharmaceutics* 8: 1120-1131.
106. Montazeri Aliabadi H, Landry B, Mahdipoor P, Uludag H (2011) *Induction of Apoptosis by Survivin Silencing through siRNA Delivery in a Human Breast Cancer Cell Line*. *Molecular pharmaceutics* 8: 1821-1830.
107. Nakahara T, Yamanaka K, Hatakeyama S, Kita A, Takeuchi M, et al. (2011) *YM155, a novel survivin suppressant, enhances taxane-induced apoptosis and tumor regression in a human Calu 6 lung cancer xenograft model*. *Anti-cancer drugs* 22: 454-462.
108. Kenny GD, Kamaly N, Kalber TL, Brody LP, Sahuri M, et al. (2011) *Novel multifunctional nanoparticle mediates siRNA tumour delivery, visualisation and therapeutic tumour reduction in vivo*. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 149: 111-116.
109. Hannon GJ (2002) *RNA interference*. *Nature* 418: 244-251.
110. Silva JM, Hammond SM, Hannon GJ (2002) *RNA interference: a promising approach to antiviral therapy?* *Trends Mol Med* 8: 505-508.
111. Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P (2004) *Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways*. *Mol Cancer Ther* 3: 187-197.
112. Stordal B, Davey M (2007) *Understanding cisplatin resistance using cellular models*. *IUBMB Life* 59: 696-699.

113. Pruefer FG, Lizarraga F, Maldonado V, Melendez-Zajgla J (2008) Participation of Omi Htra2 serine-protease activity in the apoptosis induced by cisplatin on SW480 colon cancer cells. *J Chemother* 20: 348-354.
114. Baldwin EL, Osheroff N (2005) Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5: 363-372.
115. Karpnich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL (2002) The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 277: 16547-16552.

## ANEXO 1

---

### Abreviaturas

ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
Apaf-1	Factor 1 activador de caspasa apoptótica
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2	Leucemia de células B-2
BIR	Repetición IAP baculoviral
BRUCE/BIRC6	Enzima conjugadora de ubiquitina que contiene una repetición BIR
CARD	Dominio de reclutamiento para caspasas
CARPs	Proteínas RING asociadas a las caspasas 8 y 10
Cdc2	Cinasa dependiente de ciclina 2
CDE/CHR	Elemento dependiente del ciclo celular/Región de homología a genes del ciclo celular
c-FLIP	Proteína inhibidora de FLICE celular
ciAP1/BIRC2	IAP celular 1
ciAP2/BIRC3	IAP celular 2
FADD	Proteína asociada a Fas vía dominio de muerte
HBXIP	Proteína que interactúa con la proteína X de la hepatitis B
IAPs	Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis
ILP-2/BIRC8	Proteína 2 tipo IAP
INCENP	Proteína interna del centrómero
JNK	Cinasa amino terminal de c-Jun
ML-IAP/BIRC7	IAP de melanoma
MTS	Esferoides tumorales multicelulares
NAIP/BIRC1	IAP neuronal
Omi/HtrA2	Proteína A2 que requiere alta temperatura

RING	Nuevo gen realmente interesante
RNAi	RNA de interferencia
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Smac/DIABLO	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/Proteína de unión directa a IAP de bajo punto isoeléctrico
TRAFs	Factores asociados al receptor de TNF
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF
UBC	Conjugadora de ubiquitina
XIAP/BIRC4	Inhibidor de apoptosis unido al cromosoma X

### ***Abreviaturas de medidas***

h	Horas
kDa	Kilodaltones
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
pM	Picomolar
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar

### ***RNA de interferencia***

El silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi), es una respuesta biológica conservada en diferentes organismos multicelulares, la cual media la resistencia a ácidos nucleicos patógenos y regula la expresión de genes que codifican proteínas [109].

Esta técnica se basa en un silenciamiento génico post-transcripcional muy eficiente basado en la degradación de RNA mensajeros específicos por medio de pequeños RNAs de 21-23 nucleótidos [109]. En la célula, un RNA de doble cadena (RNA<sub>dc</sub>) es reconocido por una maquinaria que comienza con una ribonucleasa RNasa III denominada Dicer, esta enzima corta RNA<sub>dc</sub> generando pequeños RNA de interferencia (siRNAs) los cuales son RNAs dúplex de aproximadamente 22 nucleótidos. A continuación, estos siRNAs son incorporados a una nucleasa multicomponente efectora llamada RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA), la cual deshebra a los siRNAs por medio de una helicasa, con el siRNA de una sola hebra en conjunto con el RISC reconoce y destruye RNAm blanco secuencia-específico [110].

### **Mecanismos de acción de los fármacos**

#### **Estaurosporina**

La estaurosporina es un potente inhibidor de proteínas cinasa. Ha sido ampliamente utilizado *in vitro* como un inductor de apoptosis en muchas líneas celulares. Sin embargo, los mecanismos por los cuales induce apoptosis, aún no se conocen con exactitud. Se ha sugerido que la vía intrínseca tiene un papel importante en la apoptosis inducida por estaurosporina. Sea reportado el requerimiento de activación de caspasas para la muerte inducida por estaurosporina, pero también se han sugerido mecanismos independientes de caspasas. La vía dependiente de caspasas se asocia a la activación de Bax y liberación de Smac/DIABLO y del citocromo c, mientras que en la vía independiente de caspasas podría estar involucrado AIF [111].

#### **Cisplatino**

El cisplatino se une covalentemente al ADN con preferencia a la posición N-7 de la guanina y la adenina. En consecuencia, se produce una unión cruzada entre dos bases de ADN mediante el desplazamiento del otro ligando cloro [112]. El cisplatino interfiere en la construcción del ADN a través de distintos mecanismos, alterando la mitosis celular. El ADN dañado dispara mecanismos de reparación, lo que acaba generando la apoptosis celular cuando esta reparación resulta imposible. Recientemente se ha demostrado que la apoptosis inducida por el cisplatino en las células del cáncer de colon humano depende de la serina-proteasa mitocondrial Omi/Htra2 [113].

#### **Etopósido**

El etopósido es un importante agente antineoplásico utilizado para el tratamiento de una amplia gama de tumores. El blanco principal del etopósido es la topoisomerasa II. Esta enzima remueve el sobreenrollamiento del genoma al introducir cortes transitorios en la doble hebra del ADN. El etopósido estabiliza



al complejo covalente enzima-ADN cortado, que es un intermediario en el ciclo catalítico de la topoisomerasa II. La acumulación de estos complejos de corte en células tratadas, conduce a la generación de cortes permanentes en el material genómico, lo cual dispara las vías de recombinación/repáraci3n, mutagénesis y translocaciones cromosomales. Si los cortes permanecen, la célula puede iniciar las vías de muerte [114]. En este caso, el daño al ADN activa a la proteína DNA-PK, que a su vez fosforila y activa a p53. La fosforilaci3n de p53 resulta en la regulaci3n positiva de proteínas implicadas en el control del ciclo celular y la apoptosis [115].

**ANEXO 4**

---

**ARTÍCULO**