



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA
SURVIVINA DELTA-EXÓN 3
MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA
EN CÉLULAS DE CÁNCER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

JULIA ROSALINDA MENDOZA PÉREZ

Tutora: M. en C. Magali Espinosa Castilla

México D.F.,

NOVIEMBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología bajo la asesoría de la M. en C, Magali Espinosa Castilla

*A mis padres Julia y Eduardo que son la luz de mi vida,
con cariño para ustedes este gran logro.*

*A mi hermanita Sandra y a todos los miembros
de mi preciosa familia por permanecer a mi lado
en este camino de la vida.*

*A mis chicas y amigos que estuvieron siempre
conmigo brindándome su apoyo incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis M. en C. Magali Espinosa Castilla por todo el apoyo brindado a lo largo de este proyecto, así como por sus constantes y acertadas opiniones.

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por permitirme formar parte del INCAN y comenzar una nueva etapa de mi vida dentro del área de investigación.

Al resto de los miembros del jurado quienes con sus valiosos comentarios y sugerencias contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo: Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. María de Lourdes Segura Valdez y Dr. Victor Manuel Ruiz López.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias y del laboratorio por su amistad y confianza depositada en mí. Gracias por todos los buenos momentos que compartimos a lo largo de todo este tiempo.

En especial a mis amigos: Pamela, Alejandra, Claudia, Adriana, Rosa, Jonathan, Carlos por sus consejos y muestras de apoyo en los momentos más difíciles. Gracias por confiar en mí.

A los integrantes de la familia Mendoza y la familia Pérez, a mis primos, tíos y a mi abue, que en conjunto estuvieron alentándome a cada instante.

A mis padres y hermana por todo lo que me han dado a lo largo de mi vida y por su estímulo constante.

A todos aquellos cuya ayuda fue indispensable para la realización de este proyecto.

“El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere sino querer siempre lo que se hace”.

Leon Tolstoi

Índice

I. Introducción

Cáncer

Apoptosis

Caspasas

Vías Apoptóticas

Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs)

Survivina

Survivina y el Ciclo Celular

Isoformas de la Survivina

Dímeros de la Survivina

Survivina y Cáncer

Isoformas y Cáncer

Inhibición de la Survivina

RNA de Interferencia

II. Objetivos

General

Particulares

III. Diseño Metodológico

Líneas Celulares

Cultivo Celular

Viabilidad Celular

Cristal Violeta

Extracción de RNA total

Síntesis de DNA complementario

Reacción en Cadena de la Polimerasa, Semicuantitativo (PCR)

Diseño del RNA de Interferencia dirigido contra la Survivina DeltaExón3

Alineación de Oligos para el RNA de Interferencia

Digestiones con enzimas de Restricción Específicas

Purificación del Vector

Ligación

Transformación

Amplificación del Plásmido, MaxiPREP (CTAB)

Transfección

Sensibilidad a Fármacos Antineoplásicos

Morfología Apoptótica

IV. Resultados

Expresión de la Survivina y sus Isoformas en Líneas Celulares de Cáncer

Inhibición del RNAi de la Survivina DeltaExón3 en Líneas Celulares de

Cáncer con la Técnica de RNA de Interferencia

Diseño del RNA de Interferencia

Construcción del Vector con el RNAi para la Survivina DeltaExón3

Efecto Inhibitorio y Especificidad del RNAi dirigido contra la Survivina

DeltaExón3 en Líneas Celulares de Cáncer (HeLa y SW48)

V. Discusión y Conclusiones

VI. Bibliografía

VII. Anexo I

Abreviaturas

Abreviaturas de Medidas

Palabras Clave: Cáncer, Apoptosis, Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs), Survivina Delta-Exón 3, RNA de Interferencia, estaurosporina, etopósido.

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales, en los cuales las células transformadas son el resultado de alteraciones acumuladas en el DNA. La proliferación y la muerte celular son procesos opuestos, pero esenciales para una célula. El balance entre los procesos de proliferación y muerte celular es crítico para el desarrollo normal y para mantener la homeostasis de los organismos adultos (Guo M. y Hay B., 1999). La alteración en el proceso de muerte celular o apoptosis ocurre en parte por proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) que se encuentran sobre expresadas en diversos tipos de cáncer.

La survivina es un miembro de esta familia que está implicada tanto en la regulación del ciclo celular como en la inhibición de la apoptosis. Se han descrito 5 isoformas de la survivina. Dos de estas variantes generadas por splicing alternativo fueron descritas por Mahotka y col., en 1999; la survivina- Δ Ex3 a la que le falta el exón 3 y la survivina 2B que retiene una parte del intrón 2 como un exón crítico, denominado exón 2B. Esta isoforma posee un potencial antiapoptótico muy reducido. Badran y col., en el 2004 descubrieron una tercera isoforma a la cual denominaron survivina 3B. Esta isoforma comprende 5 exones, pues incluye un nuevo exón 3B, contiene el dominio BIR intacto el cual es esencial para la inhibición de la apoptosis, por lo que se cree que la survivina 3B conserva la actividad antiapoptótica. En el año 2005 Caldas y col. identificaron y caracterizaron una nueva isoforma, la survivina 2 α , la cual consta de 2 exones: exón1 y exón2, esta proteína co-localiza en el citoplasma con la survivina y tiene el potencial de atenuar su efecto antiapoptótico *in vitro*.

La eliminación del exón 3 en el caso de la survivina- Δ Ex3 resulta en un marco de lectura diferente en el exón 4 y con el dominio BIR truncado. A pesar de estas modificaciones estructurales, la survivina- Δ Ex3 conserva las propiedades antiapoptóticas similares a las de la survivina (Mahotka y col., 1999). Esta variante, a diferencia de la survivina tipo tiene una señal de localización nucleolar (NoLS), que es capaz de translocar a la survivina- Δ Ex3 dentro del nucleolo. Posee una señal de degradación la cual es responsable de su rápido

recambio en el nucleolo vía proteosoma. Con esta señal, la proteína es degradada mucho más rápido que la survivina (Song y col., 2005). Finalmente, no actúa como una proteína pasajera cromosomal durante el ciclo celular (Song y col., 2005; Noton y col., 2005).

Estas características de la survivina- Δ Ex3 indican que dicha isoforma es una potente proteína antiapoptótica. Además juega un papel muy importante al contribuir con la progresión del tumor. En el presente trabajo se diseñó y construyó exitosamente el primer RNA de interferencia específico para el silenciamiento de la survivina- Δ Ex3. Mediante esta técnica de inhibición post-transcripcional se evaluó el efecto que tiene la proteína en el proceso de sensibilidad apoptótica a fármacos antineoplásicos, como es el caso del etopósido, con este estudio se observó que la carencia de dicha proteína en las células cancerosas le provee a dichas células cierta resistencia a los fármacos antineoplásicos que inducen apoptosis mediante el daño al DNA. Con esto se concluye que la survivina- Δ Ex3 participa de manera importante en el proceso de apoptosis inducida por agentes genotóxicos e incluso podría participar en el fenómeno de resistencia a dichos fármacos.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales, en el cual las células transformadas son el resultado de una serie de alteraciones acumuladas en el DNA. Estas alteraciones tienen lugar en un grupo de genes, denominados genes críticos del cáncer debido a que su mutación contribuye al desarrollo del cáncer. Estos genes se clasifican en proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA; el riesgo de cáncer se produce por un exceso de actividad de su producto génico (ganancia de función) o por su falta de actividad (pérdida de función). Ambos tipos de mutaciones producen efectos parecidos sobre la proliferación celular y la supervivencia (Alberts y col., 2002).

La proliferación y la muerte celular son procesos opuestos, pero esenciales para una célula. El balance entre los procesos de proliferación y muerte celular, es crítico para el desarrollo normal y para mantener la homeostasis de los organismos adultos (Guo M. y Hay B., 1999).

Apoptosis

El término apoptosis fue implementado por primera vez por Currie y sus colegas en 1972 para describir un tipo de muerte celular que observaban repetidamente en varios tejidos y tipos celulares con características fisiológicas y bioquímicas específicas (Kerr y col., 1972). La apoptosis no induce inflamación y se lleva a cabo de manera normal para el recambio celular durante la embriogénesis y en tejidos adultos (Jacobson y col., 1997).

Cuando la célula recibe un estímulo intra o extra celular que la conduce a la muerte, pierde contacto con las células vecinas y su citoplasma se contrae provocando así una disminución en el tamaño celular (Hengartner M.O., 2000). Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos (Fletcher S., 1994), la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se

fragmenta. Finalmente la célula genera vesículas rodeadas de membrana plasmática íntegra que contienen parte de la cromatina y de los organelos celulares, estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos (Cohen J.J., 1993), los cuales exponen a la cara externa de la membrana celular al fosfolípido fosfatidilserina (FS), ésto es una señal suficiente para inducir la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Fadok V.A. y col., 1992; Martin S.J. y col., 1995).

La maquinaria enzimática responsable de los cambios que presenta la célula durante el proceso apoptótico la constituye principalmente la familia de las caspasas (Hengartner M.O., 2000).

Caspasas

Las caspasas conocidas también como proteasas de cisteína, cortan a sus sustratos después de un residuo de aspartato. Estas enzimas son sintetizadas como zimógenos dentro de la célula, los cuales necesitan de activación proteolítica durante la muerte celular por apoptosis (Riedl S.J. y Shi Y., 2004).

Las caspasas apoptóticas están divididas en dos clases: las caspasas iniciadoras que incluyen las caspasas 2, 8, 9 y 10 y las caspasas efectoras que incluyen las caspasas 3, 6 y 7 (Riedl S.J. y Shi Y., 2004).

Las caspasas efectoras cortan e inactivan proteínas vitales para la célula; enzimas de reparación de ADN como PARP (poli(ADP-ribosa) polimerasa), proteínas del citoesqueleto (laminina, gelsolina, actina, fodrin), proteínas del ciclo celular (Retinoblastoma (Rb), p53, MDM2), así como el rompimiento del DNA mediante la activación de DNasas (Cohen, 1997).

Vías apoptóticas

Se han descrito dos cascadas o vías de señalización de apoptosis convergentes, la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. La vía extrínseca se lleva a cabo al momento de recibir una señal pro-apoptótica iniciada por un receptor, tal como lo es iniciada por Fas (Apo-

1/CD95). La activación del receptor en la superficie celular es dada por el Ligando de Fas (FasL) que induce la trimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas adaptadoras como FADD (Proteína Asociada a Fas con Dominio de Muerte), esta proteína posee también un dominio efector de muerte (DED) mediante el cual interactúa con el dominio DED de la pro-caspasa 8, o pro-caspasa 10 favoreciendo así su reclutamiento y posterior activación (Delhalle y col., 2003) (Fig.1).

En la vía intrínseca participan proteínas que son liberadas de la mitocondria. El citocromo c liberado se une a Apaf 1 (Factor Apoptótico 1 activador de proteasas) y a la procaspasa 9 formando un complejo denominado apoptosoma. Una vez activa la caspasa 9 esta actúa sobre varias caspasas efectoras, como la caspasa 3 (Delhalle y col., 2003) (Fig.1).

A pesar de ser dos vías activadas por diferentes estímulos, la proteína Bid permite una conexión entre la vía extrínseca y la intrínseca. Bid es sustrato de la caspasa 8 activa, que al ser cortada, se transloca a la mitocondria permitiendo así la liberación de citocromo c (Gross y col., 1999) (Fig.1).

Las vías moleculares que conducen a la muerte celular apoptótica están altamente conservadas evolutivamente y son controladas por proteínas que promueven o impiden la muerte celular. Se han descrito varios reguladores de la apoptosis; la familia de Bcl-2 (Linfoma 2 de Células B), la familia de las IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis) y la familia de FLIP (Proteínas Inhibitorias de la Caspasa 8) (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

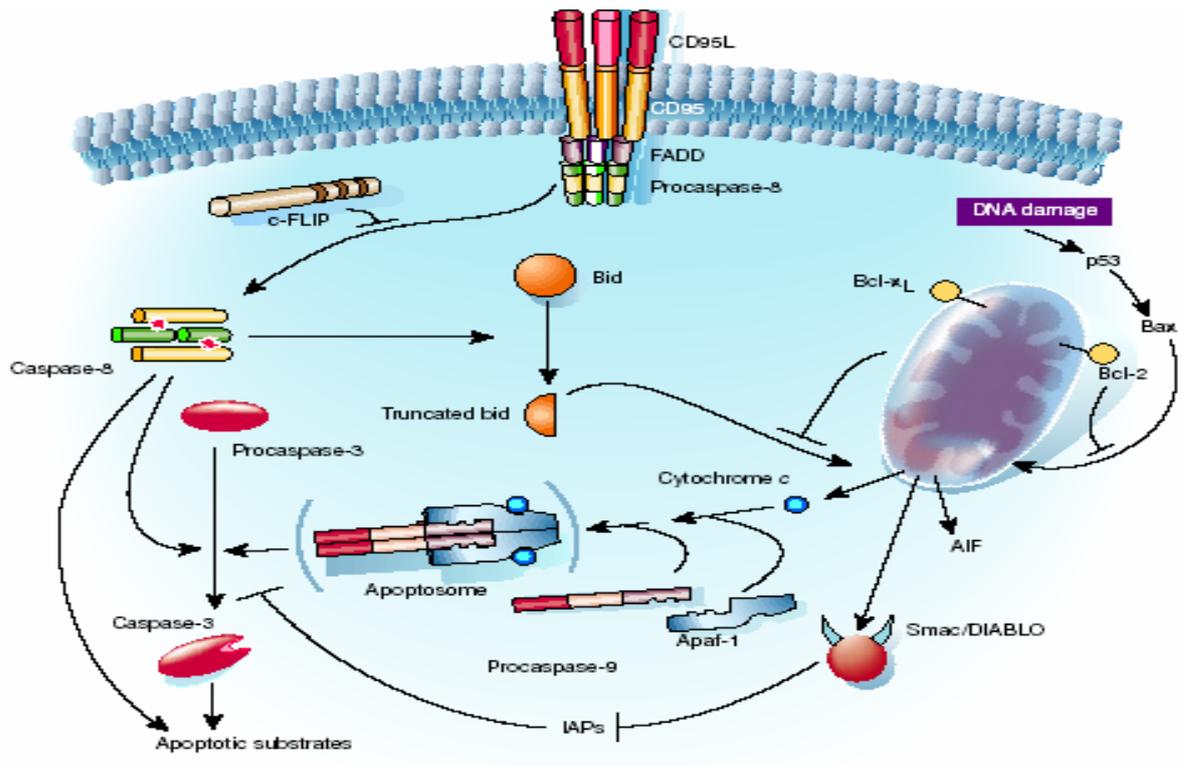


Figura 1. Principales vías de muerte celular en mamíferos (Hengartner M., 2000).

La evasión a la muerte celular por apoptosis puede deberse a una sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, como las proteínas de la familia de Bcl-2 o de la familia de las IAPs (Delhalle y col., 2003) o a la activación constitutiva de factores de transcripción, como el factor nuclear- κ B (NF- κ B), que induce la transcripción de proteínas antiapoptóticas y/o proteínas que suprimen genes proapoptóticos los cuales son determinados por la naturaleza de los estímulos de muerte así como por el origen del tejido (Kuhnel F. y col., 2000).

Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs)

El mecanismo por el cual las IAPs inhiben al proceso apoptótico es inhibiendo directamente a las caspasas. Las IAPs son las únicas proteínas endógenas que regulan la actividad tanto de las caspasas iniciadoras como de las caspasas efectoras (Liston P. y col., 2003). La familia de estas proteínas se caracteriza por

tener un dominio de alrededor de 70 aminoácidos repetidos en tándem llamado dominio BIR (Repeticiones de IAPs Baculovirales) (Millar L.K. y col., 1999). Se han identificado de una a tres copias del dominio BIR en esta familia de proteínas, este dominio es necesario para la unión a residuos de zinc (Fig.2) (LaCasse y col., 1998). Algunas IAPs contienen un segundo dominio que se encuentra invariablemente en el extremo carboxilo de la proteína, llamado dominio RING (Anillo de Dedo de Zinc), el cual tiene actividad de ligasa ubiquitina E3 (Fig. 2).

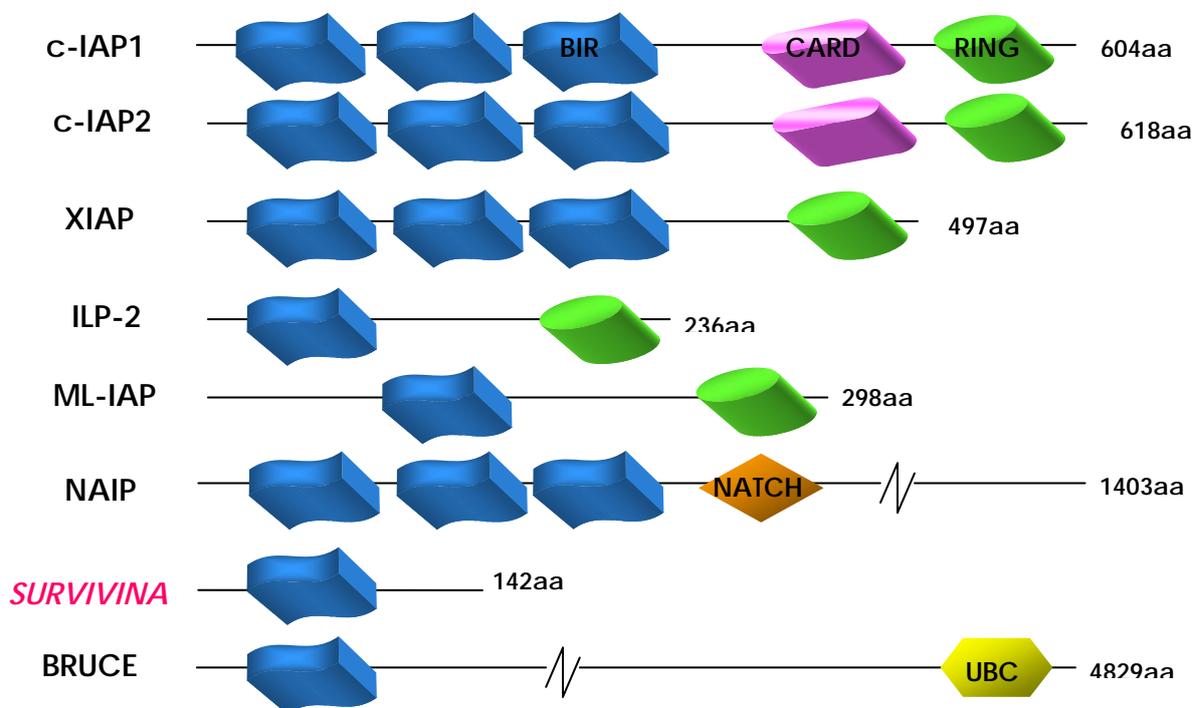


Figura 2. Proteínas Inhibidoras de Apoptosis descritas en humanos

Survivina

En 1997, Ambrosini y colaboradores identificaron a un nuevo miembro de la familia IAP, survivina. Esta proteína, única entre las IAPs de mamíferos, contiene solamente un dominio BIR y le falta el dominio RING en el extremo carboxilo (Tamm y col., 1998). Es una proteína de vida media corta ($t_{1/2} = 30\text{min}$) y su poliubiquitinación se encuentra seguida por su degradación vía proteasoma

(Zhao y col., 2000).

Se ha observado que la sobreexpresión de la survivina se encuentra asociada con la inhibición de la muerte celular por apoptosis ya sea vía intrínseca o extrínseca (Ambrosini y col., 1997; Tamm y col., 1998; Mahotka y col., 1999; Islam y col., 2000; Zaffaroni y col., 2002). Como es el caso de otras IAPs, las interacciones físicas entre la survivina y las caspasas iniciadoras o efectoras *in vitro* han sido reportadas por diversos grupos que demostraron la interacción física entre la survivina y la caspasa 3 en estudios *in vivo* (Tamm y col., 1998; Kobayashi y col., 1999; Kasof y Gomes, 2001; Li F. y col. en 1999).

La survivina está altamente expresada durante el desarrollo embrionario en humanos y parece ser importante en la contribución de la homeostasis y la diferenciación de los tejidos. Sin embargo, el gen se vuelve quiescente en la mayoría de los tejidos terminalmente diferenciados (Johnson y Howerth, 2004). La mayoría de los tumores humanos expresan niveles altos de la proteína survivina, lo que sugiere que ocurre una reactivación de la expresión del gen de la survivina en cáncer (Ambrosini y col., 1997). Se ha reportado que esta proteína se expresa en los cánceres humanos más comunes, incluyendo cáncer de pulmón (Monzo y col., 1999), mama (Tanaka y col., 2000), colon (Kawasaki y col., 1998), estómago (Lu y col., 1998), esófago (Kato y col., 2001), páncreas (Sato y col., 2001), vejiga (Swana y col 1999), útero (Sayito y col., 1999), ovario (Yoshida y col., 2001), hígado (Ito y col., 2000), así como también en linfomas no-Hodgkin de alto grado en donde es un factor de mal pronóstico (Ambrosini y col., 1997).

Survivina y el ciclo celular

La survivina está implicada en la regulación del ciclo celular. Se expresa en las células durante la fase G2/M del ciclo celular, continuando con una disminución del RNA mensajero y de los niveles de proteínas en la fase G1 (Zhao y col., 2000).

La fosforilación de la survivina en la Thr34 por p34^{cdc2}/ciclinaB1 se ha visto asociada con el aumento en la estabilidad de la survivina durante la metafase (O'Connor y col., 2002).

En etapas tempranas de la mitosis la survivina se localiza en los centrómeros (Fig. 3a), al disociarse la envoltura nuclear en la prometafase la survivina permanece en los centrómeros unida a un nuevo eje para-polar (Fig. 3b), en la metafase los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial y la survivina se une a los cinetocoros (Fig. 3c), durante la anafase la survivina se puede ver en la región media de la placa, mientras los cromosomas migran hacia los polos (Fig. 3d), en la telofase la survivina se localiza en los residuos del aparato mitótico (Fig. 3e) y finalmente en la citocinesis la survivina se localiza en la parte media del surco (Fig. 3f)(Caldas y col., 2005).

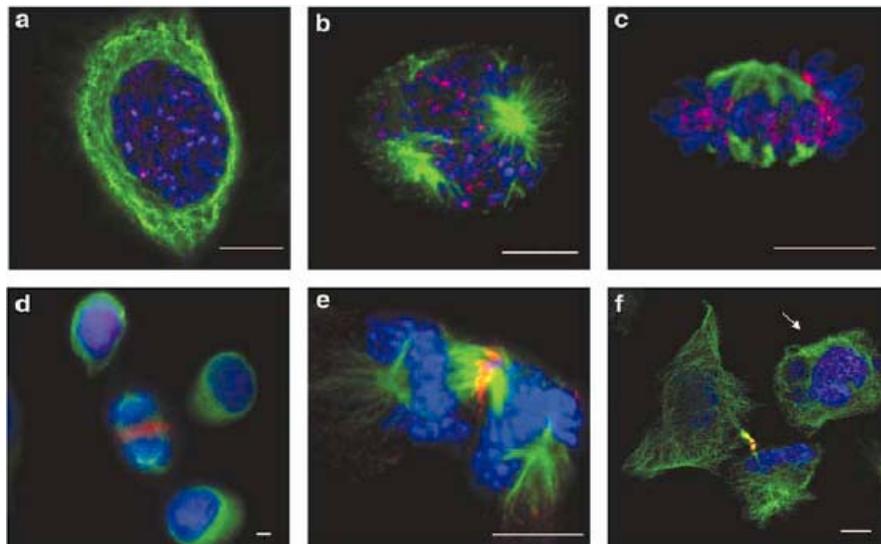


Figura 3. Localización subcelular endógena de la expresión de la survivina durante el ciclo celular. Se puede observar la survivina en rojo y la tubulina en verde. La survivina se excluye del núcleo en la fase G2 del ciclo celular. (Caldas y col., 2005).

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 (Kallio y col., 2001).

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. Existe evidencia de que Aurora B se encuentra físicamente asociada con la proteína interna del centrómero (INCENP) en la mitosis y que tiene interacciones con la survivina, asociándose a la survivina como una proteína pasajera cromosomal (Bolton y col., 2002).

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 (fosforilación de la histona H3), 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 (Vagnarelli y col., 2004).

Isoformas de la Survivina

Se han descrito 5 isoformas de la survivina. Mahotka y col., en 1999, describieron dos de estas nuevas variantes generadas por splicing alternativo; la survivina- Δ Ex3 a la que le falta el exón 3 (118pb) y la survivina 2B que retiene una parte del intrón 2 (69pb) como un exón críptico, denominado exón 2B,

esta isoforma posee un potencial antiapoptótico muy reducido (Mahotka y col., 1999). La eliminación del exón 3 en el caso de la survivina- Δ Ex3 resulta en un marco de lectura diferente y con el dominio BIR truncado; a pesar de estas modificaciones estructurales, la survivina- Δ Ex3 preserva las propiedades antiapoptóticas similares a las de la survivina (Mahotka y col., 1999) (Fig. 3).

La survivina tipo y la survivina- Δ Ex3 han sido las isoformas más estudiadas. La survivina DeltaEx3 a diferencia de la tipo tiene una señal de localización nucleolar (NoLS) que es capaz de translocar a la survivina- Δ Ex3 dentro del nucleolo, posee una señal de degradación la cual es responsable de su rápido recambio en el nucleolo vía proteasoma, con esta señal la proteína es degradada mucho más rápido que la survivina; estas dos características parecen requerirse para que esta isoforma preserve su función antiapoptótica (Song y col., 2005) y finalmente, no actúa como una proteína pasajera cromosomal durante el ciclo celular (Song y col., 2005; Noton y col., 2005).

Badran y col., en el 2004 descubrieron una tercera isoforma a la cual denominaron survivina 3B, esta isoforma comprende 5 exones, pues incluye un nuevo exón 3B de 165pb derivado de una porción del intrón 3, contiene el dominio BIR intacto el cual es esencial para la inhibición de la apoptosis, por lo que se puede creer que la survivina 3B conserve la actividad antiapoptótica (Badran y col., 2004), por otro lado carece del dominio de cola enrollada en el carboxilo terminal, necesario para la interacción con la tubulina, sugiriendo así que esta isoforma no se encuentra asociada con la fase G2/M (Badran y col., 2004) (Fig. 4).

En el 2005 Caldas y col. identificaron y caracterizaron una nueva isoforma, la survivina 2α , la cual consta de 2 exones: exón1 y exón2, co-localiza en el citoplasma con la survivina y tiene el potencial de atenuar el efecto antiapoptótico de la survivina *in vitro*. Esta proteína de 74aa contiene un dominio BIR truncado y carece del carboxilo; dichas características estructurales predicen que la survivina 2α no posee propiedades antiapoptóticas (Caldas y col., 2005) (Fig. 4).

Las diferentes 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- Δ Ex3 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 (Mahotka C., y col. 2002). Se ha visto que la survivina 2 α co-localiza en el citoplasma con la survivina (Caldas y col., 2005).

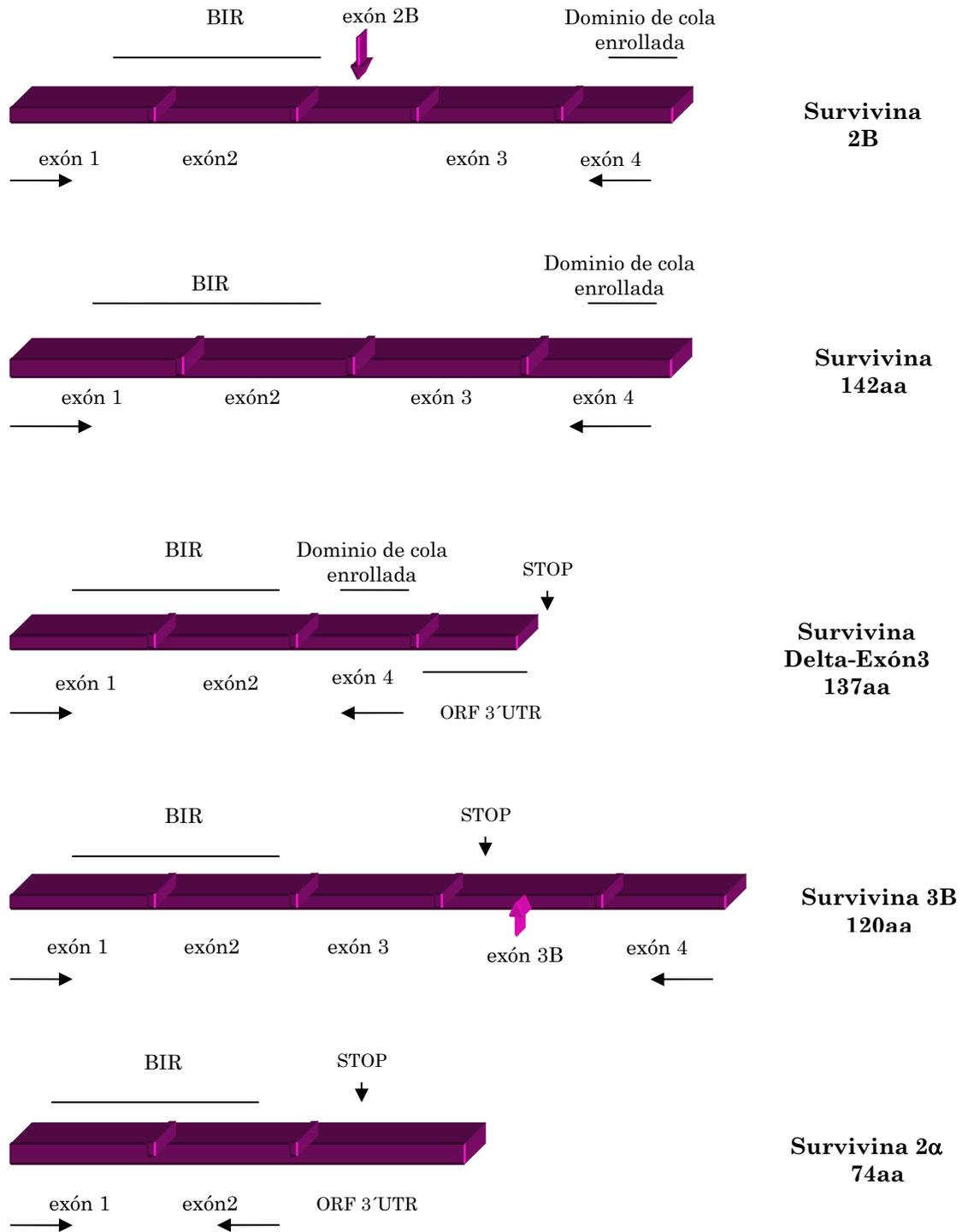


Figura 4. Isoformas de la survivina. El transcrito de la survivina tipo con 4 exones, la survivina 2B con un exón adicional (exón 2B) insertado entre los exones 2 y 3, la survivina Delta-Ex3, con una pérdida del exón 3, la survivina 3B con un exón3B insertado entre los exones 3 y 4 (Badran y col., en 2004) y la survivina 2α que sólo posee el exón 1 y 2. (Caldas y col. 2005).

Dímeros de la survivina

La estructura de la survivina forma dímeros inusuales en forma de lazos, las hélices del carboxilo terminal contienen grupos hidrofóbicos con el potencial de formar interacciones proteína-proteína. La inusual forma y dimensiones de la survivina sugieren que sirve como un adaptador a través de sus extensiones hélices alfa (Chantalat y col., 2000; Verdecia y col., 2000).

Estudios recientes reportaron que la survivina 2B y la survivina- Δ Ex3 pueden co-immunoprecipitar con la survivina tipo, al ser transfectadas transitoriamente en las células. Esto demuestra que las variantes generadas por splicing alternativo de la survivina pueden heterodimerizar entre ellas (Caldas y col., 2005). 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- Δ Ex3 interactúan directamente con la survivina tipo (Noton y col., 2005).

Se ha hipotetizado 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 (Mahotka y col., 2002). Por otro lado 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- Δ Ex3 debido a que las tres variantes producidas por splicing alternativo de la survivina provienen de un mismo pool 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 (Meng y col., 2004).

Survivina y Cáncer

Una de las características clínicas significativas de la survivina es su distribución diferencial en muchos tipos de cánceres comparado con su limitada expresión normal en tejidos bien diferenciados. La sobre-expresión de la survivina se encuentra consistentemente asociada con los tipos de tumores más agresivos

y con un pobre pronóstico en relación a los tumores que poseen una expresión menor o bien que son negativos para survivina, por ejemplo, la mucosa oral normal y piel son negativos para la survivina; en contraste con el 56% y 64% de los carcinomas orales y carcinomas cutáneos escamosos que son positivos a la survivina (Muzio y col., 2001).

Considerando lo anterior, se han realizado estudios en pacientes con cáncer tratando de identificar a la proteína survivina para así proveer un marcador temprano de cáncer. Se han detectado anticuerpos dirigidos contra la survivina en el suero de pacientes con cáncer de pulmón, cáncer colorectal (Rohayem y col., 2000) y en cáncer gastrointestinal (Yagihashi y col., 2001) mostrando así que la alta prevalencia de anticuerpos anti-survivina hace que la survivina sea considerada uno de los mayores antígenos cancerosos y que estos anticuerpos anti-survivina puedan ser un nuevo marcador para el diagnóstico por lo menos en estos tipos de canceres (Rohayem y col., 2000).

Isoformas y Cáncer

En cuanto a la expresión de las isoformas de la survivina en el cáncer, se ha investigado la presencia de la survivina y la de la survivina 2B en neuroblastoma (NBL). Se encontraron altos niveles de expresión del RNAm de la survivina, los cuales estuvieron asociados principalmente con estadios avanzados de NBL. En cuanto a la expresión de la survivina 2B los niveles fueron bajos y estuvo presente en los NBLs de pronóstico favorable, sugiriendo así que aumenta la muerte celular programada (Islam y col., 2000).

En estudios más recientes se encontró que la alta expresión de la survivina y de la survivina- Δ Ex3 se encuentra preferencialmente expresada en tumores cerebrales malignos y gliomas, mientras que la survivina 2B se encuentra mayormente en tumores benignos (Yamada y col., 2003).

En el carcinoma renal, se encontró que todas las muestras analizadas expresaron survivina- Δ Ex3, survivina 2B y survivina, siendo esta última el transcrito dominante. No se encontraron diferencias significativas en los niveles

de expresión de la survivina y la survivina- Δ Ex3, pero se observó un decremento en la expresión de la survivina 2B en los estadios más avanzados (Mahotka y col., 2002).

Krieg y col, analizaron carcinomas gástricos de diferentes subtipos histológicos, grados y estadios. Compararon los estadios I+II con III+IV, y observaron que mientras la expresión de survivina y de survivina- Δ Ex3 permanece inalterable, existe un decremento de la expresión de survivina 2B conforme avanzaban los estadios (Krieg y col., 2002). Otro estudio realizado por Meng y colaboradores realizado en el 2004, en cáncer gástrico, se demostró también que los niveles de expresión del RNAm de la survivina son de gran valor para el pronóstico, sugiriendo que la participación de la survivina 2B en el desarrollo del cáncer gástrico es de gran importancia ya que sus niveles de RNAm correlacionan de manera negativa con el estadio del tumor, el tipo histológico y así como la invasión del tumor; mientras que la survivina- Δ Ex3 mostró una correlación negativa entre el índice apoptótico y su nivel de expresión.

En el 2003 O'Driscoll y colaboradores reportaron que tanto la survivina, la survivina- Δ Ex3 y la survivina 2B están presentes en cáncer de mama con un porcentaje de 68, 55 y 9.4% respectivamente, encontraron que las tres isoformas se detectaron en una proporción alta en carcinomas. Los RNAm de la survivina, survivina 2B y survivina- Δ Ex3 fueron detectados en niveles bajos en tejido de mama normal, comparado con los carcinomas primarios. Sin embargo, se encontró una débil relación inversamente significativa entre la survivina- Δ Ex3 y el tamaño del tumor, así como el número de nódulos metastásicos (Ryan B., y col. 2005).

En estudios realizados en cáncer cérvicouterino, la survivina y sus isoformas no fueron detectadas en tejido cervical normal, en contraste con la sobreexpresión observada en las muestras de cáncer. En este estudio no se encontró una asociación entre la expresión de la survivina y el estadio clínico, histología o el estadio menopáusico. Se encontró que en los pacientes con los tumores de adenocarcinoma más agresivos clínicamente expresaban altos niveles de survivina 2B y de survivina- Δ Ex3 (Espinosa M. y col., 2006).

Estudios obtenidos en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con meduloblastoma se evaluó la expresión de las isoformas de la survivina, survivina 2B y survivina- Δ Ex3 y se encontró que la survivina tipo es la isoforma expresada en mayor cantidad, seguida por la survivina 2B y finalmente por la survivina- Δ Ex3 la cual de cierta forma se encuentra altamente expresada en comparación con el cerebelo humano normal; en este estudio se demostró que los niveles de expresión de la survivina correlacionan con un mal pronóstico y funcionan como marcador de morfología tumoral y de resultado clínico (Fangusauro y col., 2005).

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 (Okada y col., 2001), cáncer de mama (D'Amico y col., 2001; Kennedy y col., 2003), cáncer de vejiga (Lehner y col., 2002) y osteosarcoma (Trieb y col., 2003), 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 (Grabowski y col., 2003), en linfoma del manto celular (Martínez y col., 2004) carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Shinohara y col., 2004); estas diferencias en el pronóstico con respecto a la distribución de la survivina nuclear entre los diferentes estudios es probablemente tumor-específico (Shinohara y col., 2004). 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 distribución subcelular en el citoplasma con un pobre pronóstico en varios tipos de cánceres, entre ellos, linfomas de células B (Adida y col., 2000), carcinoma colorectal (Sarela y col., 2000), neuroblastoma (Azuhata y col., 2001), cáncer gástrico (Ikeguchi y col., 2002), carcinomas de células escamosas de esófago (Kato y col., 2001), cáncer colorectal (Kawasaki

y col., 1998), carcinoma de vejiga (Ku y col., 2004), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Monzo y col., 1999), y en tumores epiteliales de ovario (Sui y col., 2002). En un estudio realizado por Ponnelle y colaboradores en el año 2005, proveen 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.

Inhibición de la Survivina

Considerando que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular inducida por diversos agentes anticancerosos y de radiación ionizante; el papel de la survivina es considerado un posible blanco para determinar la quimio y radio sensibilización de las células tumorales, así pues, desde que la survivina se ha visto asociada con los microtúbulos y el huso mitótico, es posible que esta proteína pueda específicamente contribuir a la respuesta de las células frente a agentes que interactúan con los microtúbulos. (Zaffaroni y col., 2005).

Otro punto importante es su capacidad para participar en la inhibición de la muerte celular por apoptosis, así como en la regulación del ciclo celular y por lo tanto el hecho de inhibirla radica en que el crecimiento del tumor sería inhibido, a través del incremento de la apoptosis y del aumento en la sensibilidad de las células tumorales tanto a los agentes quimioterapéuticos como a la radiación (Altieri, 2003).

Recientemente se han realizado estudios utilizando diversos antagonistas moleculares dirigidos contra la survivina, incluyendo oligonucleótidos antisentido, ribozimas, RNA de interferencia y dominantes negativos para lograr su inhibición. Con ayuda de oligonucleótidos antisentido de la survivina, se ha observado que las células que tienen bajos niveles de survivina son más sensibles a la quimioterapia (Mei y col., 2001; Olie y col., 2000). Así pues, reduciendo la abundancia del RNAm de la survivina en células de adenocarcinoma de pulmón se observa una disminución en la proliferación

celular de forma dosis-dependiente así como un aumento en la apoptosis, en este mismo experimento se realizaron ensayos de quimio-sensibilidad, indicando que una disminución en la survivina potencia la sensibilidad de las células a los agentes antineoplásicos (Olie y col., 2000). De esta manera, se ha sugerido que la survivina puede actuar como un factor inducible de resistencia a la radioterapia y/o quimioterapia, en células de cáncer.

Otra estrategia alternativa es el desarrollo de ribozimas dirigidas contra diferentes porciones del RNAm de la survivina, y se observó un aumento en la apoptosis inducida por diversos agentes como lo es el cisplatino, topotecan y la radiación, en líneas celulares de melanoma (Pennati y col., 2002, 2003 y 2004).

Uno de los aspectos importantes a considerar en la construcción de dominantes negativos de la survivina, es su sitio de fosforilación en la Thr(34) puesto que tiene implicaciones importantes para entender su potencial en la regulación del ciclo celular, con la mutación en la Thr34 en Ala se elimina el sitio de fosforilación de la ciclina dependiente de cinasa p34^{cdc2}. Mesri y col., construyeron un adenovirus que posee la survivina mutante Thr(34)-->Ala; la infección con este adenovirus causó apoptosis espontánea en líneas celulares de cáncer de mama, cérvicouterino, próstata, pulmón y colorectal. En contraste, este adenovirus no afectó la viabilidad de células humanas normales en proliferación. Grossman y col., en 1999 fueron los primeros en demostrar que la transfección de células de melanoma con la survivina mutante (Cys(84) -->Ala), defectuosa en su fosforilación aumentó la muerte celular inducida por cisplatino y disminuyó la tasa del crecimiento tumoral en líneas celulares de melanoma. Recientemente Tu y col., en el 2005 mostraron una terapia basada en la utilización de vectores virales en un modelo *in vivo*, observándose la inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral.

Tanto la expresión selectiva de la survivina como su función antiapoptótica, provee el uso de esta molécula como posible marcador diagnóstico, así como un potencial blanco para el tratamiento del cáncer (Zaffaroni y Daidone, 2002).

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 (Hannon y col., 2002).

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 (Hannon, y col., 2002). En la célula, un RNA de doble cadena (RNAdc) es reconocido por una maquinaria que comienza con una ribonucleasa RNasa III denominada Dicer, esta enzima corta RNAdc generando pequeños RNA de interferencia (siRNAs) los cuales son RNAs dúplex de aproximadamente 22 nucleótidos, con 2 nucleótidos 3' overhang (que sobresalen o cuelgan) y el extremo 5' fosforilado (Zamore, 2000); ésta conformación es necesaria para que el siguiente componente de la maquinaria los reconozca y pueda continuar el proceso de silenciamiento génico. 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 (Hammond, 2000). La destrucción del RNAm blanco es por un corte endonucleolítico generado por una endoribonucleasa que sólo ocurre en la región homóloga al siRNA, este RNAm ya cortado es degradado por completo mediante la acción de exoribonucleasas (Hannon, 2002)(Fig. 5).

Por otro lado, una vez formado el complejo RISC con el siRNA de una sola hebra puede reconocer al RNAm blanco y utilizarlo como molde para amplificar la señal interferente, convirtiéndolo en RNA de doble cadena (RNAdc) con ayuda de una RNA polimerasa dependiente de RNA(RdRp), la cual utiliza un siRNA primario como iniciador para sintetizar la cadena complementaria y así generar nuevamente RNAdc de mayor tamaño, el cual es degradado por la enzima Dicer generando así siRNA secundarios y

amplificando así el fenómeno de interferencia, lo cual aumenta la efectividad del sistema (Déctor y col., 2004) (Fig. 5).

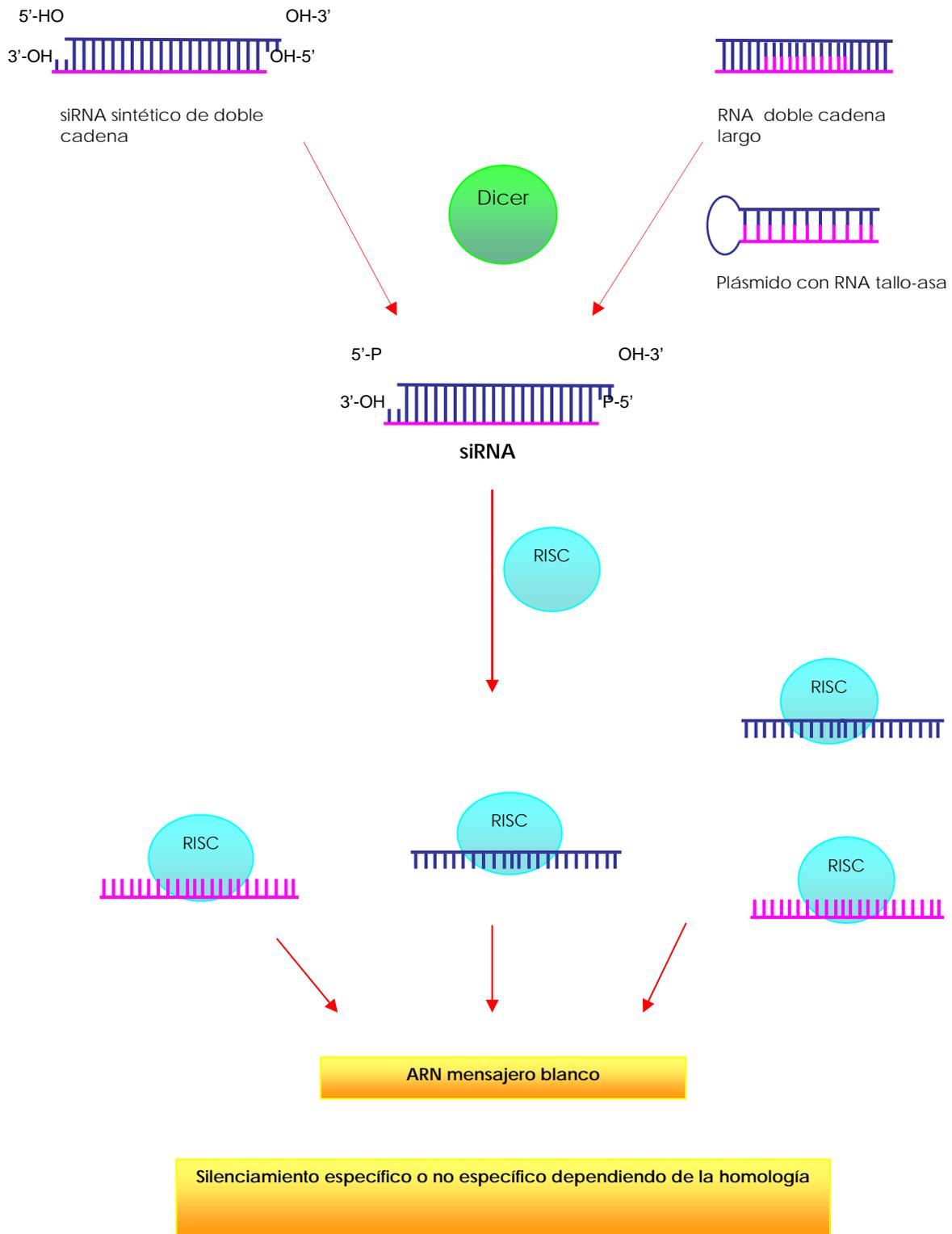


Figura 5. Esquema del silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia (Mittal y col., 2004).

Actualmente el RNA de interferencia ha sido desarrollado como una herramienta muy útil para determinar la función de un gen en particular, mediante la inhibición de la expresión de genes blanco, con respecto a las estrategias convencionales presumiblemente por el hecho de que es un proceso natural.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto que tiene el RNA de interferencia dirigido contra la survivina DeltaEx3 en células de cáncer

Particulares

- 1) Determinar la expresión de la survivina y sus isoformas en líneas de cáncer

- 2) Inhibir el RNAm de la survivina DeltaExón3 en líneas de cáncer con la técnica de RNA de interferencia.
 - a) Diseñar el RNAi dirigido contra la survivina DeltaExón3

 - b) Construir el vector con el RNAi para la survivina DeltaExón3

 - c) Comprobar el efecto inhibitorio y su especificidad del RNAi dirigido contra la survivina DeltaExón3 en líneas celulares de cáncer (HeLa y Sw48)

- 3) Analizar si la inhibición de la isoforma DeltaExón3 de la survivina aumenta la sensibilidad a apoptosis inducida por fármacos antineoplásicos.

DISEÑO METODOLÓGICO

Líneas Celulares

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

SW48. Línea celular derivada de adenocarcinoma colorectal (Número: ATCC CCL-231).

Cultivo Celular

Las líneas celulares fueron cultivadas en monocapa en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 5%(v/v) de Suero Fetal Bovino (SFB). Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v).

Viabilidad Celular

Las células Sw48 y HeLa fueron sembradas en placas de 48 pozos a 80% de confluencia y expuestas a distintas concentraciones de los fármacos antineoplásicos para determinar el IC₅₀. Las concentraciones utilizadas con la estaurosporina fueron 100nM, 200nM y 300nM se incubaron durante 24 h y con el etopósido, las concentraciones que se utilizaron fueron 50µM, 90µM y 120µM se incubaron por 48 h.

Cristal Violeta

Las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con etanol al 70% a -20°C por 10 min. y se tiñeron con Cristal Violeta (0.1% en agua). Las células teñidas se

solubilizaron en Ácido acético al 33%. La absorbancia se determinó en el lector de Elisa a 570nm. Este análisis se llevó a cabo por triplicado.

Extracción de RNA total

1 X 10⁶ de células HeLa y Sw48 se homogenizaron en trizol, se agregó cloroformo, se centrifugaron y la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol. El botón se lavó con etanol y se disolvió en agua/dietil pirocarbonato. La pureza se comprobó con la relación 260/280 y la integridad en geles de agarosa.

Síntesis de DNA complementario

La síntesis se hizo a partir de 1 µg de RNA total usando hexámeros al azar, y la enzima transcriptasa reversa termoestable de la siguiente manera: 1 µg de RNA total se desnaturizó a 65°C durante 5 min., se agregaron hexámeros sintetizados al azar, deoxinucleótidos y enzima transcriptasa reversa en el buffer adecuado. Se incubó por 50min a 50°C, la reacción se paró a 85°C y se incubó durante 20 min. a 37°C con RNAsa H.

La expresión del RNA mensajero se normalizó con la expresión de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). 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.

Reacción en Cadena de la Polimerasa, semicuantitativo (PCR)

El DNA complementario (cDNA) sirve como templado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los componentes de la PCR en adición al cDNA, incluyen deoxinucleótidos (dNTPs), buffer, enzima DNA polimerasa termoestable y primers específicos para el gen de interés. El cDNA es amplificado exponencialmente por medio de ciclos de desnaturalización, alineación y extensión.

Las condiciones para este ensayo son: 5µl de Buffer 10x (1x), 1µl de deoxinucleótidos 10 mM (0.04 mM), 0.25µl de polimerasa Amplitaq (5U/µl), 2µl de primers 1nM/µl (10picoM) y 3µl de MgCl₂ 25mM (1.5 mM).

En la amplificación del cDNA de los diferentes genes, se utilizaron oligos específicos para cada uno, como se describe a continuación.

SURVIVINA:

Sentido 5'CGATGATTCATGAGTGCGTCAACGTTGC 3'

Antisentido 5'AGCCCTCTAGAGTTGCCTCGCTGCATTGCA 3'

SURVIVINA 2B:

Sentido 5' CCAGTTGGACGGATGATCCGAG 3'

Antisentido 5' CTGGACCGTTCGTCGCACCTT 3'

SURVIVINA 3B:

Sentido 5' AGTGACCGACTGTGAGCACCCAGAAT 3'

Antisentido 5' ATTGATGGTATCCTTAGCCGGTCTC 3'

SURVIVINA DELTAEXÓN3:

Sentido 5' ATGACCGTATGCACAGTACGACTGACA 3'

Antisentido 5' AATCGCGAATCAAGCCAGCAATGA 3'

GAPDH:

Sentido 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3'

Antisentido 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC 3'

Los productos en fase logarítmica se analizaron en geles de agarosa y se tiñeron con Bromuro de Etidio. La intensidad de la banda se cuantificó por densitometría.

Diseño del RNA de interferencia dirigido contra la Survivina DeltaExón3

Se diseñó un RNAi para la survivina DeltaExón3 con una secuencia específica de 21 a 23 nucleótidos aproximadamente entre el exón2 y el exón4. La secuencia encontrada se analizó por BLAST (por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool) para asegurarse que no tenga secuencias homólogas con otros genes. Esta secuencia no posee sitios de restricción para alguna enzima.

Alineación de oligos para el RNA de interferencia

Para realizar la alineación de los oligos, cada par de oligos se incubaron en el buffer de alineación por una noche a 54 °C. Se comprobó la adecuada alineación en un gel de acrilamida.

Primer par de oligos

Survivina 1a, CCGGACGACCCCAGCAAAGGAAAA y Survivina 1b,
CTAGTTTCCTTTGCTGGGGTCGT

Alineación Inserto 1

```
5' CCGGACGACCCCAGCAAAGGAAAA      3'
3'      T GCT GGGGTCG T T T CCT T T T GATC 5'
```

Al alinearse los oligos se forman los sitios para las enzimas Age I y Spe I

Segundo par de oligos

Survivina 2a, CTAGTTTCCTTTGCTGGGGTCGTCCGGTTTTCTGCA y Survivina 2b,
GAAAACCGGACGACCCCAGCAAAGGAAAA

Alineación Inserto 2

```
5' CTAGTTTCCTTTGCTGGGGTCGTCCGGTTTTCTGCA      3'
3'      AAAAGGAAACGACCCCAGCAGGCCAAAAAAG 5'
```

El segundo inserto tiene los sitios para las enzimas Spe I y Pst I

Digestiones con enzimas de restricción específicas

Las digestiones se realizaron con 5µg de DNA, con las enzimas correspondientes, Age I, Spe I y PstI en los buffers adecuados. Se incubaron por 3 horas a 37°C.

Purificación del vector

La purificación se realizó con el Kit QIAEX II de Qiagen. Los productos se purificaron de un gel de agarosa con partículas de sílica que optimizan la recuperación de fragmentos de DNA. Todas las impurezas que no son ácidos nucleicos como es el caso de la agarosa, proteínas, sales y el bromuro de etidio son removidas durante los pasos en los que se llevan a cabo los lavados con un buffer que es alto en sales y elimina los residuos de agarosa, por otro lado se lava con un Buffer que contiene etanol y eficientemente remueve los contaminantes de sales. El pellet se deja secar y finalmente el DNA puro es diluido en 20µl de buffer Tris o agua.

Ligación

Se realizaron ligaciones con las relaciones 1:1 y 1:3, utilizando 100 ng de vector y la cantidad correspondiente del inserto. Las ligaciones se incubaron toda la noche a 16°C con la enzima DNA ligasa T4 (Kit Rapid DNA Ligation and transformation).

Transformación

Para la transformación se utilizó el Kit TransforAid™ Bacterial Transformation Kit #K2711 de Fermentas. Se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5alfa. Se crecieron en medio C el cual permeabiliza la membrana de las bacterias para facilitar la inserción del plásmido por dos horas a 37°C con movimiento. Las ligaciones se incubaron con las bacterias DH5alfa. Se plaqueó en placas de medio LB agar/ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche.

Amplificación del plásmido, MaxiPREP (CTAB)

Las colonias seleccionadas se crecieron en medio LB con ampicilina por 12 horas a 37°C en movimiento.

Del precultivo se inocularon 200µl en un matraz con 50 ml de medio LB con ampicilina. El cultivo se dejó toda la noche a 37 °C en movimiento, hasta alcanzar una absorbancia de OD₆₀₀ = ~ 0.6.

Posteriormente se centrifugó el cultivo de bacterias y al paquete celular se le añadió la solución de lisis alcalina I la cual contiene glucosa 50mM, TrisCl 25mM pH 8 y EDTA 10mM pH 8 para resuspender el botón de bacterias. Posteriormente se le añadió la solución de lisis alcalina II la cual es preparada al momento con NaOH (0.2N) y SDS (1%), ésta es para permeabilizar y romper las membranas. Posteriormente se le adicionó la solución III, que contiene acetato de potasio 5M y ácido acético glacial para neutralizar y evitar que las membranas se sigan rompiendo. Se centrifugaron nuevamente y al sobrenadante se le adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol, el botón se resuspendió en el volumen apropiado de agua o TE pH 8. Se añadió LiCl 4M, se centrifugó y el sobrenadante se precipitó con isopropanol. El botón se resuspendió en agua y se incubó con RNasa. Se le adicionó CTAB 5% y se resuspendió en NaCl 1.2M. Finalmente, el botón se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en TE.

El plásmido se calentó a 50°C en baño maría durante 5min. Se cuantificó con el espectrofotómetro y la pureza se comprobó con la relación 260/280.

Transfección

Se sembraron 1×10^6 de células Sw48 y HeLa en cajas de 60mm y se transfectaron las células con $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del vector pIRES-GFP utilizando Escort (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del protocolo, para así poder determinar una eficiencia de transfección adecuada, una vez obtenida una eficiencia del 40% en células HeLa y del 70% en células SW48, se procedió a transfectar las células con $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del vector pGEM-T-Easy en el cual está clonado el promotor U6 (vector vacío) así como del vector pGEM-T-Easy en el cual se encuentra clonado el RNAi dirigido contra la survivina DeltaExón3 bajo el control del promotor U6.

Sensibilidad a fármacos antineoplásicos

Se sembraron 6×10^3 células Sw48 en placas de 48. Posteriormente fueron transfectadas con $1\mu\text{g}$ de pGEM-Teasy con RNAi dirigido contra la survivina $\Delta\text{Exón3}$ y con el pGEM-Teasy que lleva solamente el promotor U6 como control, se incubaron las células durante 48 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 (v/v). Por último, se estimularon las células con los IC50 determinados previamente para cada uno de los fármacos antineoplásicos, se incubaron por 24Hr y 48Hr para estaurosporina y etopósido respectivamente a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 (v/v). Este ensayo se realizó por triplicado.

Morfología apoptótica

Las células se fijaron en etanol frío al 70% por 15 min, se pre-trataron con RNasa (10ug/ml) en PBS por 30min a 37°C . Después los núcleos fueron teñidos con Bromuro de Etidio ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) en PBS y se lavaron dos veces con PBS. Finalmente las células fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

RESULTADOS

Expresión de la survivina y sus isoformas en líneas celulares de cáncer

La expresión basal de la survivina y sus isoformas se detectó en 2 líneas celulares de cáncer: HeLa y Sw48 por medio de RT-PCR (Fig. 6). Se utilizaron oligos específicos que amplifican el marco completo de lectura.

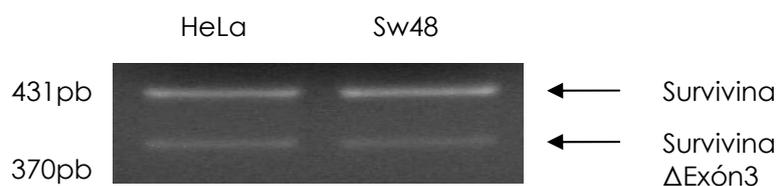


Figura 6. Expresión basal de la survivina y de la survivina DeltaEx3 en HeLa y Sw48.

Se pueden observar 2 bandas correspondientes a la survivina (431pb) y a la survivina- Δ Ex3 (370pb) en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino HeLa y cáncer de colon SW48. Como se puede apreciar en ambas líneas celulares la isoforma más abundante de estas dos isoformas es la survivina tipo.

Inhibición del RNAm de la survivina DeltaExón3 en líneas de cáncer con la técnica de RNA de interferencia

c) Diseño del RNA de Interferencia

Se eligió una secuencia de 21 a 23 nucleótidos que fuera específica para la survivina DeltaEx3. Esta secuencia se encuentra localizada entre el exón 2 y el exón 4 (Fig. 7).

Esta secuencia se analizó por BLAST para asegurarnos que fuera específica para la survivina DeltaEx3 y que no tuviera secuencias homólogas con otros genes.

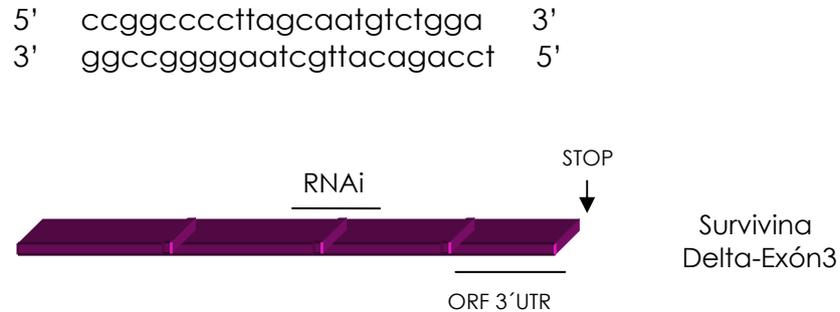


Figura 7. Esquema de la survivina DeltaEx3 y secuencia del RNAi utilizada.

Para clonar la secuencia se diseñaron 4 oligos para que fueran insertados en dos pasos, que al alinearse tuvieran sitios para enzimas de restricción y de esta forma permitir y facilitar la inserción del RNAi en el vector.

El primer par de oligos se diseñó con los sitios Age I y Spe I. El segundo tiene los sitios para las enzimas Spe I y Pst I.

Oligos 1a y 1b

5' CCGGACGACCCCAGCAAAGGAAAA 3'
3' TGCTGGGGTCGTTTCTTTGATC 5'

Oligos 2a y 2b

5' CTAGTTTTCCTTGCTGGGGTCGTCGGTTTTCTGCA 3'
3' AAAAGGAAACGACCCCAGCAGGCCAAAAG 5'

Los oligos 1a y 1b; 2a y 2b se alinearon. Se realizó un gel de acrilamida para verificar la alineación, en la siguiente figura se observa en el primer carril los

oligos simplemente mezclados en una misma reacción, mientras que en el segundo carril se aprecian los oligos alineados (Fig. 8).

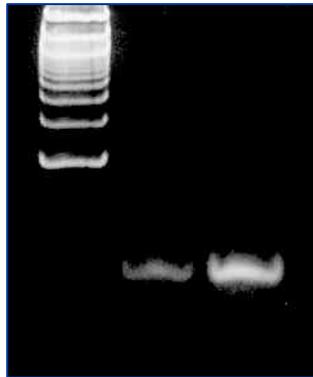


Figura 8. Alineación de los oligos

b) Construcción del vector con el RNAi para la Survivina DeltaExón3

Clonación del RNA de Interferencia

El vector elegido para clonar el RNA de interferencia fue el pGEMTeasy al que previamente se le había clonado el promotor U6 de humano. Este vector no posee un promotor eucarionte, ni secuencias enhancer (Fig. 9).

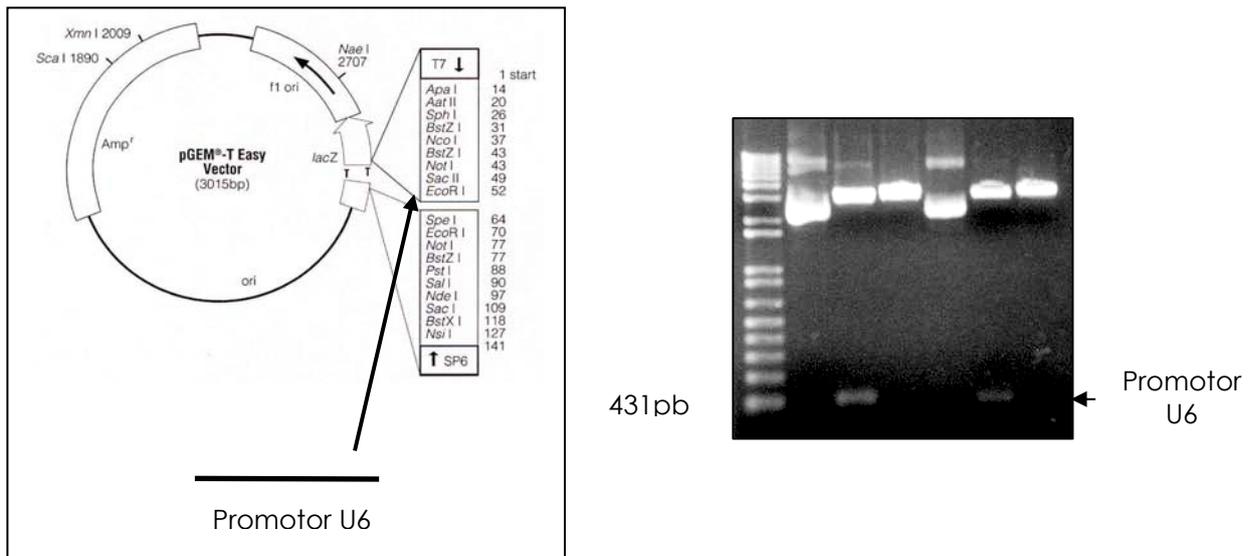


Figura 9. Mapa del vector pGEM-TEasy y clonación del promotor U6 en el vector.

Ligación

Se realizaron las ligaciones 1:1 y 1:3 con el primer oligo y con el vector digerido. Las bacterias DH5alfa se transformaron con estas ligaciones. De las colonias obtenidas se analizaron 4.

Se realizó Miniprep de las colonias cultivadas en LB y se digirieron con la enzima Age I. Al clonar el primer inserto se pierde este sitio de restricción, por lo tanto las colonias con el inserto no se digerirían. La digestión se observa en un gel de acrilamida (Fig. 10).

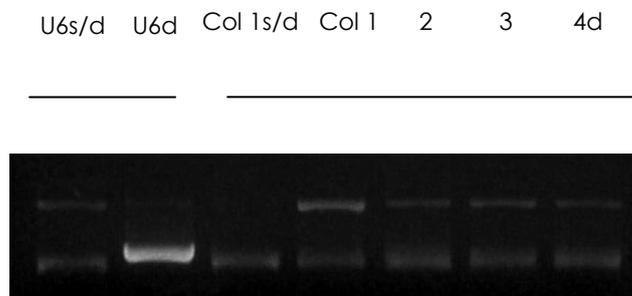


Figura 10. Digestión con la enzima de restricción Age I.

En el primer carril se encuentra el vector vacío sólo con el promotor U6 clonado sin digerir, como control positivo tenemos en el siguiente carril el mismo vector sólo con el promotor U6 clonado y por lo tanto no altera el sitio de restricción Age I haciendo posible que se digiera con dicha enzima, digerido con la enzima de restricción Age I. Los siguientes carriles son las colonias (1-4) que poseen el vector con el primer inserto clonado, como control negativo la colonia 1 sin digerir y las colonias 1, 2, 3 y 4 digeridas con la enzima Age I. Como se puede observar en el gel, todas las colonias poseen el primer inserto pues no se digieren con la enzima Age I. La banda que se encuentra arriba corresponde a DNA genómico.

Se seleccionó al plásmido que posee la colonia 1. Se amplificó y el plásmido se cuantificó y se obtuvo una concentración de 24 µg/µl con una pureza de 1.94. El vector con el primer inserto se digirió con las enzimas de restricción Spe I y Pst I para la clonación del segundo oligo. El DNA se purificó y nuevamente se

realizaron las ligaciones 1:1 y 1:3. Las bacterias DH5alfa se transformaron y se analizaron 4 de las colonias obtenidas con la ligación 3:1 (colonias 1-4) y 3 colonias obtenidas de la ligación 1:3 (colonias 5-7).

Se transformaron bacterias nuevamente y se realizó miniPREP de cada una de las colonias, posteriormente fueron digeridas con las enzimas de restricción Sal I y EcoR I para confirmar que tenían clonado el segundo inserto ya que estos sitios de restricción se pierden al clonarlo.

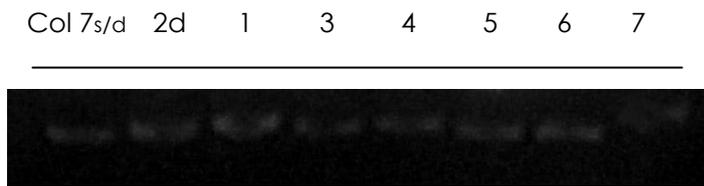


Figura 11. Digestión con las enzimas de restricción Sal I y EcoR I

En el gel de acrilamida se pueden observar las digestiones con las enzimas de restricción Sal I y EcoR I, las cuales linearizan el vector y nos permiten observar las diferencias en peso de aquellas colonias que poseen el vector con el segundo inserto clonado, en comparación con las colonias que no poseen dicho inserto. En el primer carril se tiene como control negativo la colonia 7 sin digerir para sólo observar el tamaño del plásmido sin el segundo inserto, en los carriles restantes tenemos el plásmido con las colonias 1-7 digeridas con las enzimas Sal I y Pst I. Aquellas colonias que poseen el plásmido con el segundo inserto clonado son más pesadas y por lo tanto la banda se observa más arriba. Se observó que los plásmidos con las colonias 1, 3, 4 y 7 si poseen el inserto, pues son los plásmidos que al digerirse con las enzimas de restricción Sal I y EcoR I y linearizarse pesan aproximadamente 30pb más que aquellas colonias que no poseen el segundo inserto y se encuentran en el mismo peso que la colonia 7 sin digerir.

Se seleccionó a la colonia 7 para amplificar el plásmido. El plásmido pGEMTeasy/ RNAi DeltaEx3 se cuantificó y se obtuvo una concentración de 9.53µg/µl con una pureza de 1.90.

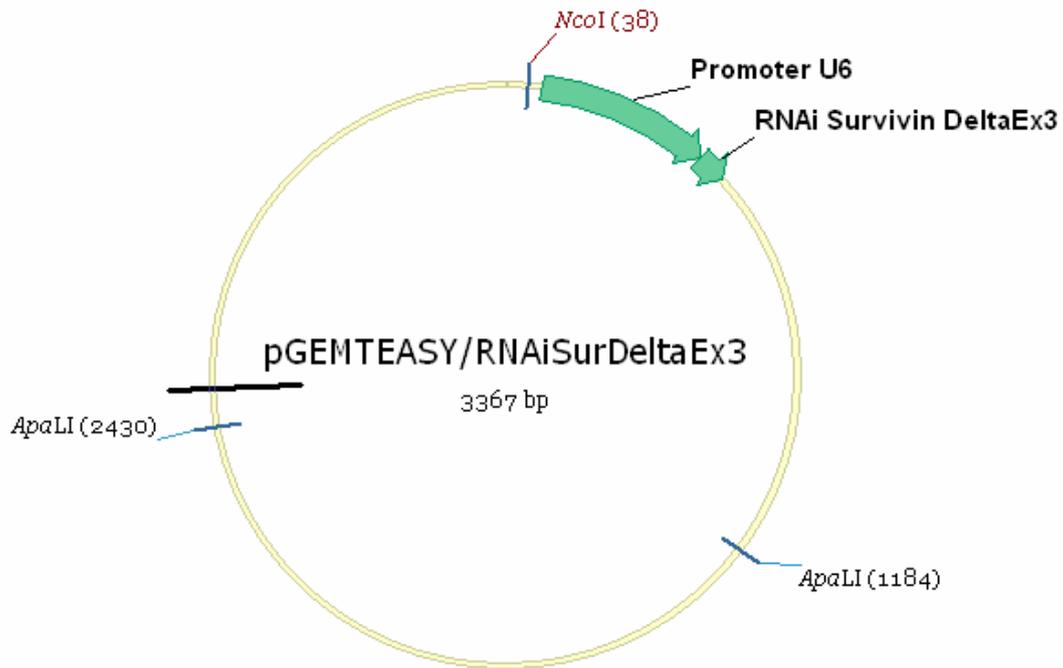


Figura 12. Mapa del pGEMTEasy/RNAi Survivina DeltaEx3

c) Efecto inhibitorio y especificidad del RNAi dirigido contra la Survivina DeltaExón3 en líneas celulares de cáncer (HeLa y SW48)

Transfección del RNAi dirigido contra survivina DeltaExón3 en líneas celulares de cáncer

Las líneas celulares HeLa y SW48 se transfectaron con los plásmidos pGEM-TEasy-U6 utilizado como control y con pGEM-TEasy-siRNA survivina Δ Ex3. La transfección se realizó con ESCORT, para evaluar la eficiencia de transfección de las células, se transfectaron simultáneamente con el vector que contiene a la proteína verde fluorescente (GFP). La eficiencia de transfección observada en cada una de las líneas celulares fue de aproximadamente del 40% en las células HeLa y del 70% en las células de cáncer de colon SW48. En la siguiente figura se puede observar una fotografía de las células SW48 transfectadas con GFP.

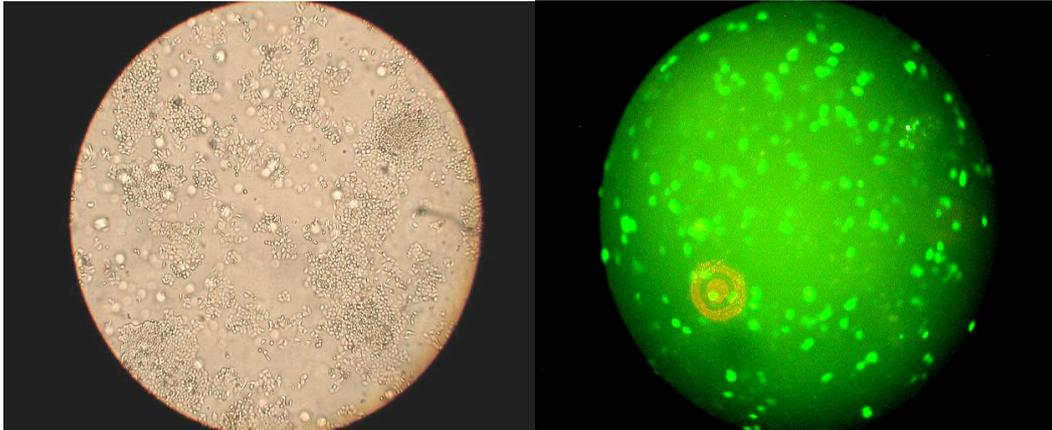


Figura 13. Transfección de células SW48 con GFP

Análisis de la eficiencia del RNAi dirigido contra la survivina DeltaEx3 mediante RT-PCR

Se realizó el análisis del RNAm de la survivina y sus isoformas, la expresión fue detectada mediante RT-PCR. Para la amplificación de las isoformas se utilizaron oligos específicos para cada isoforma.

En la figura 13 se puede observar la disminución del RNA mensajero de la survivina DeltaEx3 en las células transfectadas con el RNA de interferencia de la survivina DeltaEx3. El experimento se realizó a los tiempos de 12h y 24h, se observó la misma inhibición de la survivina DeltaEx3 en ambos tiempos y líneas celulares, en la figura sólo se muestra la inhibición de la survivina DeltaEx3 al tiempo de 24h.

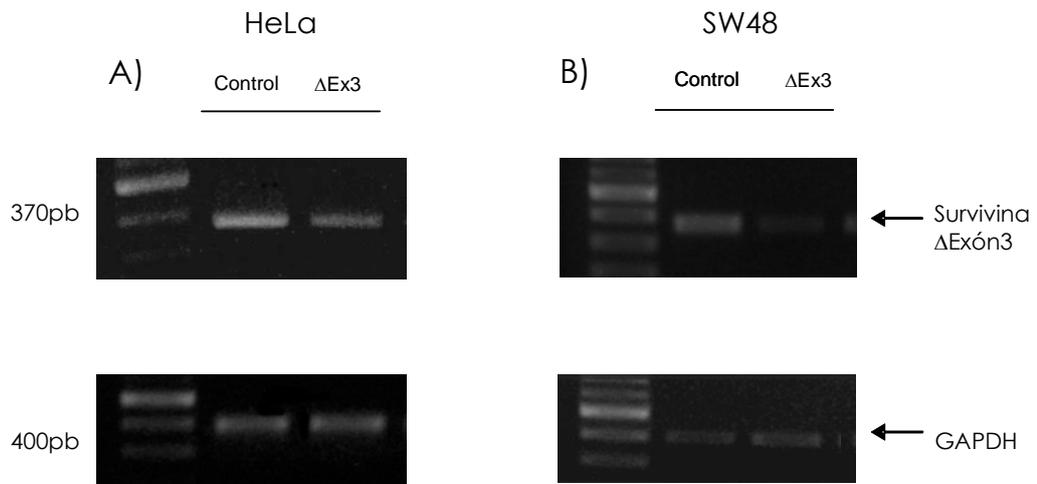
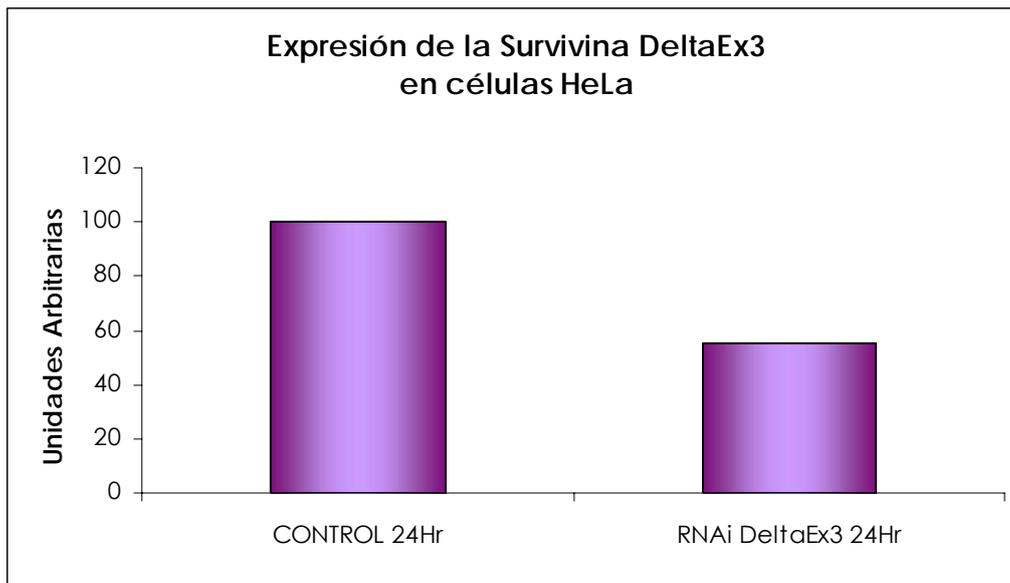


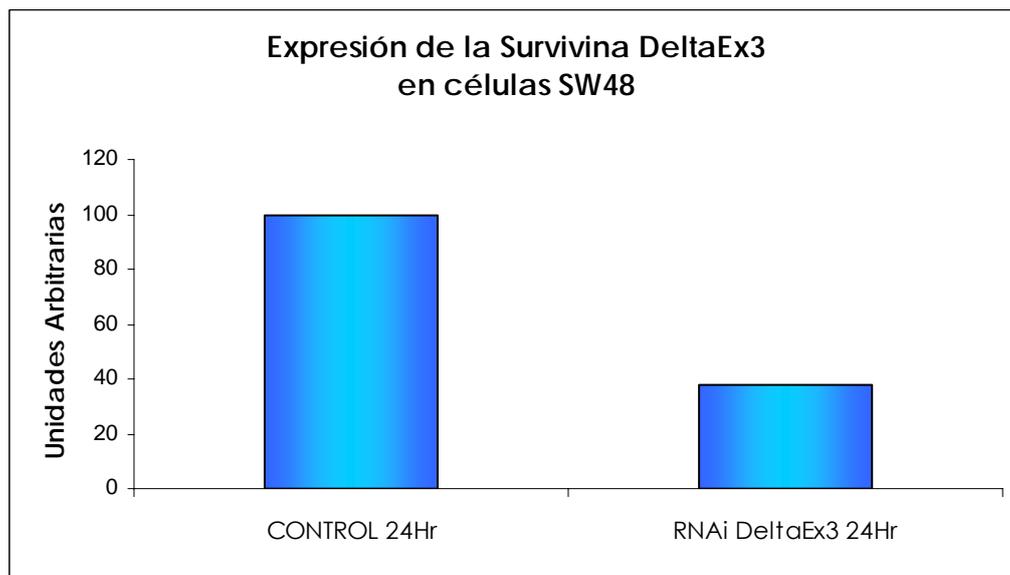
Figura 14. Amplificación por RT-PCR del RNAm de la survivina DeltaExón3 en células HeLa transfectadas con el RNAi dirigido contra la survivina DeltaExón3 a las 24hA) y en Sw48 B).

Para corroborar la eficiencia de esta inhibición, se realizaron las densitometrías correspondientes para cada una de las líneas celulares para analizar el porcentaje de inhibición del ARN de interferencia de la survivina DeltaExón3. Las siguientes gráficas muestran el porcentaje de expresión de la survivina DeltaExón3 con respecto al GAPDH, en células HeLa y SW48 (Gráfica1).

A)



B)



Gráfica 1. Densitometría. Expresión de la Survivina DeltaEx3 en células HeLa transfectadas con el RNAi de la Survivina DeltaEx3 a las 24h A) y Sw48 B).

Como se observa en la figura anterior la disminución en la expresión de la survivina DeltaEx3 debido al RNA de interferencia es considerable para ambas líneas celulares, siendo mayor la inhibición en la línea celular de cáncer de colon Sw48.

Para saber si el RNA de interferencia es específico para la survivina DeltaExón3, se analizó la expresión de las otras isoformas por medio de RT-PCR.

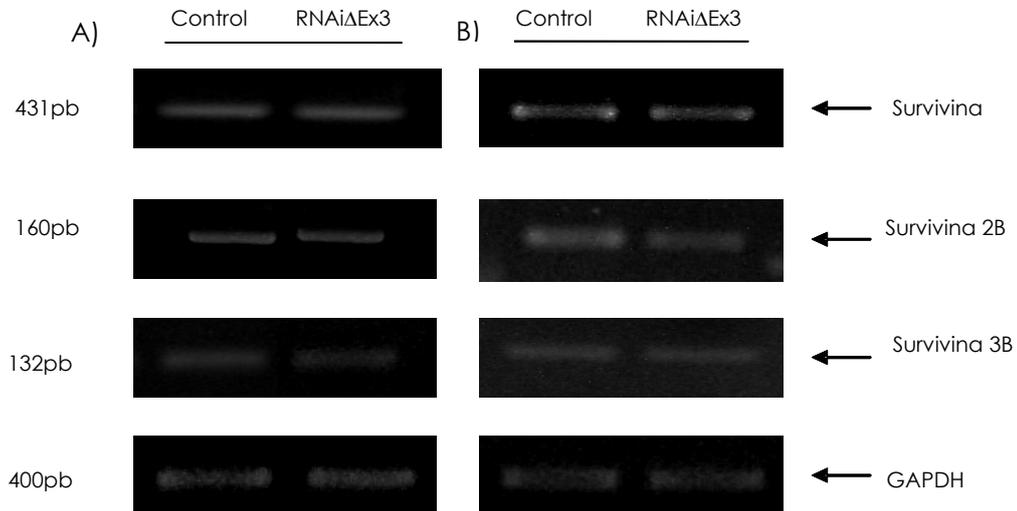


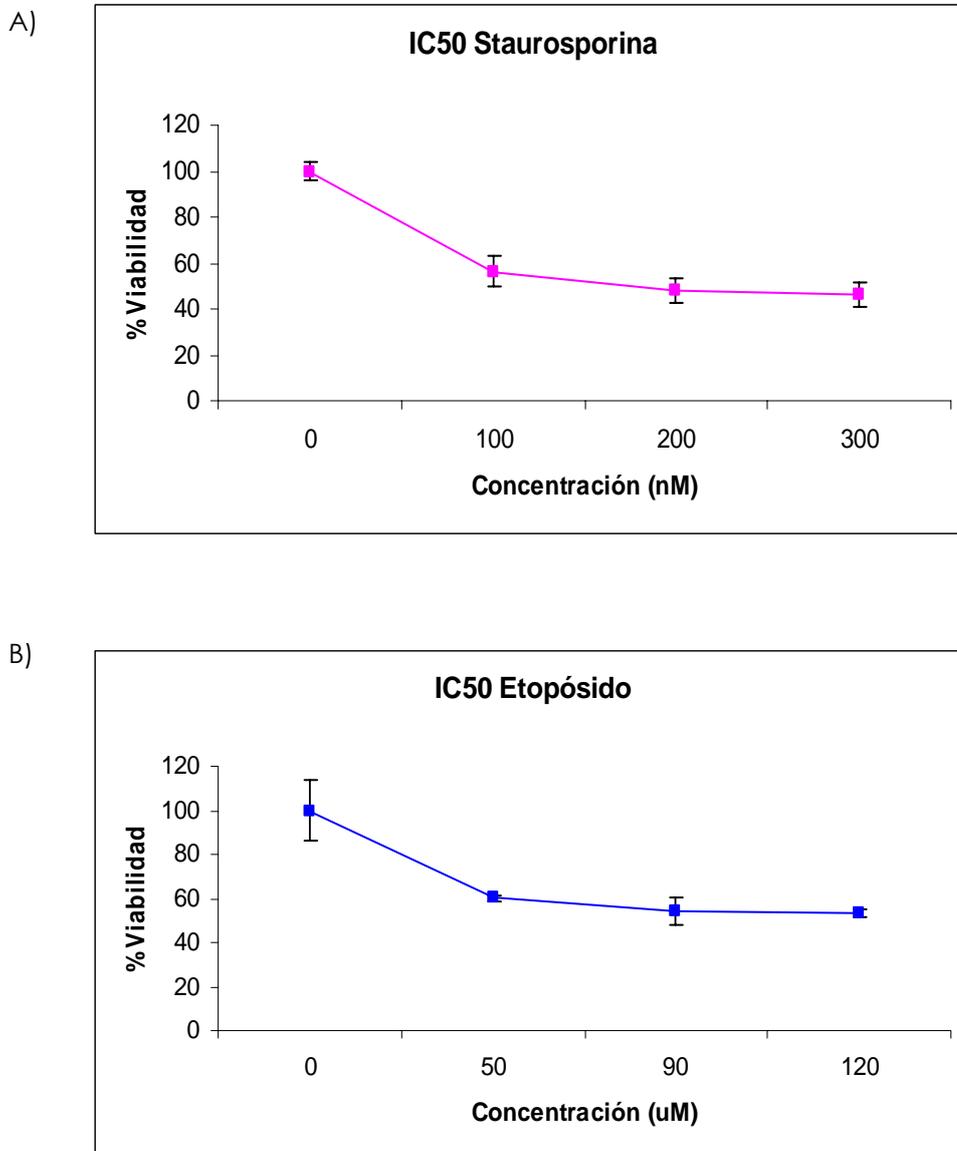
Figura 15. Amplificación por RT-PCR del RNAm de la survivina y sus isoformas en células control y células HeLa transfectadas con el RNAi de la survivina Delta Exón3 durante 24h A) y en células Sw48 B)

Como se observa en el análisis de los niveles de expresión del RNAm de las diferentes isoformas de la survivina (survivina, survivina 2B y survivina 3B) mediante RT-PCR se reveló que no existen cambios en la expresión de dichas isoformas, lo que nos indica que el RNAi de la survivina DeltaExón3 es específico de esta isoforma y no altera la expresión de las demás isoformas producidas por splicing alternativo en ambas líneas celulares.

Análisis de la sensibilidad a apoptosis inducida por fármacos antineoplásicos mediada por la inhibición de la Survivina DeltaExón3

Para determinar si la inhibición de la survivina Delta Exón3 mediante la técnica de RNAi afecta la sensibilidad a la apoptosis inducida por los fármacos antineoplásicos estaurosporina y etopósido en células de cáncer de colon

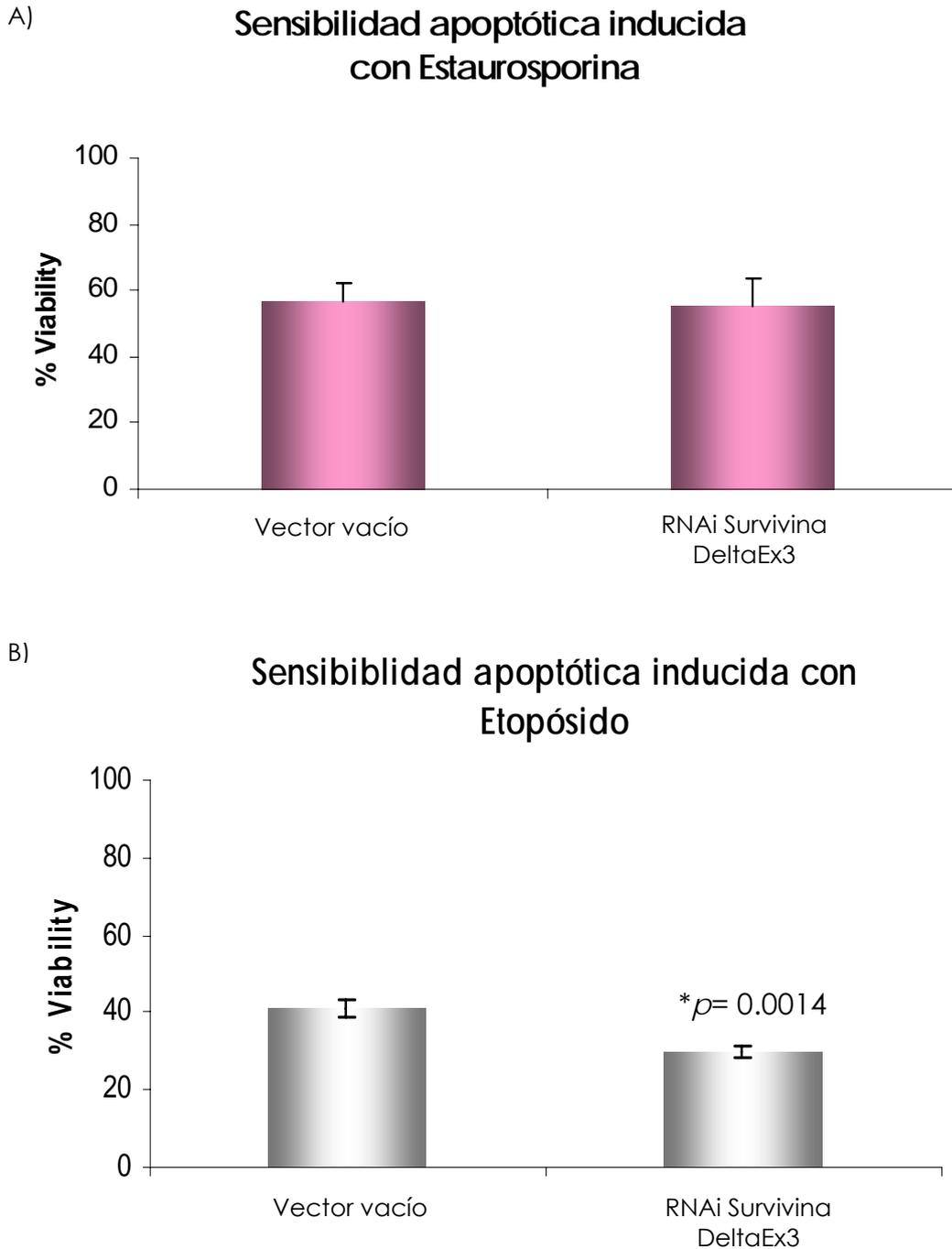
Sw48, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Primero se determinó el IC50 para cada uno de los fármacos en la línea celular Sw48 a las 24h para estaurosporina y a las 48h para etopósido (Gráfica 2).



Gráfica 2. Determinación del IC50 de los fármacos antineoplásicos en células Sw48. Las barras muestran la desviación estándar de los experimentos realizados independientemente por triplicado.

En la gráfica se puede apreciar que el IC50 del fármaco estaurosporina a las 24h es de 100nM y para el etopósido es de 82 µM un tiempo de 48h. La

disminución en la viabilidad celular inducida por estos fármacos es dependiente tanto de concentración como del tiempo de exposición. Una vez determinado el IC50 para cada uno de los fármacos antineoplásicos a utilizar en el análisis de sensibilidad apoptótica, se realizó dicho ensayo.



Gráfica 3. Sensibilidad apoptótica en células de Sw48 transfectadas con el RNAi de la survivina DeltaEx3 con los fármacos antineoplásicos estaurosporina y etopósido. Las barras muestran la desviación estándar de los experimentos realizados independientemente por triplicado.

En las gráficas anteriores podemos observar los ensayos de viabilidad celular en células de cáncer de colon Sw48 transfectadas con el RNAi dirigido contra la survivina DeltaEx3 para determinar la sensibilidad apoptótica con los fármacos antineoplásicos estaurosporina y con etopósido.

Con la estaurosporina no se observan diferencias significativas en la disminución de la viabilidad celular de las células Sw48 transfectadas con el RNAi de la survivina DeltaEx3 con respecto a las células control o bien transfectadas con el vector vacío. En cambio, con el estímulo apoptótico etopósido se puede apreciar una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de viabilidad celular de aquellas células que carecen de la survivina DeltaExón3 con respecto a las células que poseen intacta dicha isoforma, lo cual nos estaría hablando de un papel importante de la isoforma DeltaExón3 en la apoptosis inducida por estímulos genotóxicos como es el caso de etopósido.

Esta disminución en la viabilidad celular se comprobó que fuera realmente por apoptosis realizando una tinción con Bromuro de Etidio para observar la morfología celular. La siguiente figura nos muestra la tinción con Bromuro de Etidio en células SW48 transfectadas con el RNAi de la survivina DeltaEx3 con el IC50 de los agentes antineoplásicos correspondientes (estaurosporina y etopósido) (Fig. 16).

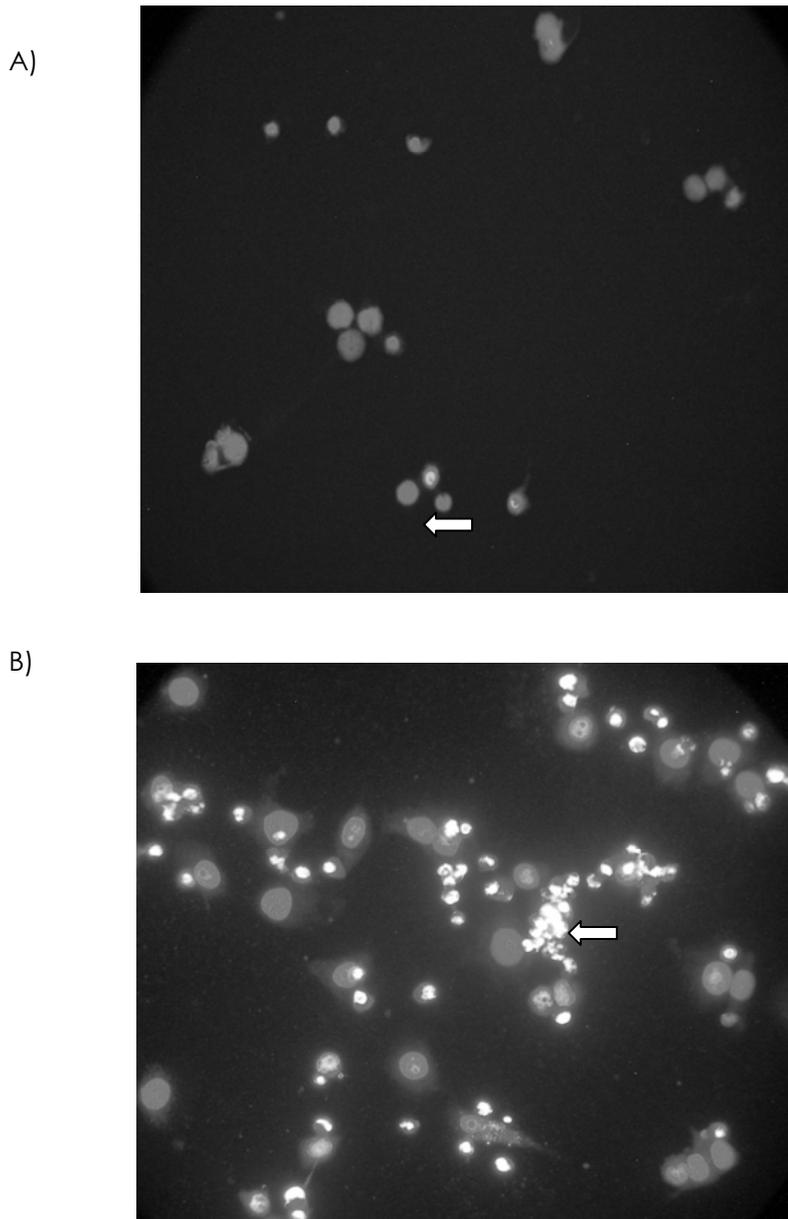


Figura 16. Morfología apoptótica. Tinción con Bromuro de Etidio de las células de cáncer de colon SW48 transfectadas con el RNAi de la survivina DeltaEx3 con los fármacos antineoplásicos estaurosporina A) y etopósido B).

En estas fotografías se observan los núcleos teñidos con Bromuro de Etidio de las células de cáncer de colon Sw48 después de haberse realizado el ensayo de sensibilidad apoptótica. Se encuentran señaladas con flechas algunas de las células que se encuentran apoptóticas y que muestran parte de la morfología apoptótica característica, como lo es, la disminución en el volumen del citoplasma, la condensación del núcleo y la fragmentación de la cromatina.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La survivina es un miembro de la familia IAP (Proteína inhibidora de apoptosis) esta familia de proteínas se encuentran implicadas tanto en la inhibición de la apoptosis como en el control del ciclo celular. La survivina se encuentra altamente expresada durante el desarrollo embrionario en humanos y parece ser importante en la contribución de la homeostasis y la diferenciación de los tejidos adultos. Sin embargo el gen se vuelve quiescente en la mayoría de los tejidos terminalmente diferenciados (Johnson y Howerth, 2004). La mayoría de los tumores humanos expresan niveles altos de la proteína survivina, lo que sugiere que ocurre una reactivación de la expresión del gen de la survivina en cáncer (Ambrosini y col., 1997). Se ha observado que esta sobreexpresión de la survivina se encuentra asociada con la inhibición de la muerte celular por apoptosis ya sea vía intrínseca o extrínseca (Ambrosini y col., 1997; Tamm y col., 1998; Mahotka y col., 1999; Islam y col., 2000; Zaffaroni y col., 2002). Estas características únicas de la survivina la hacen parecer un potencial blanco terapéutico en cáncer, puesto que posee un papel crucial en la inhibición de la muerte celular por apoptosis, además de caracterizarse por su distribución diferencial en tejido normal adulto y en células cancerosas.

De las 5 diferentes variantes formadas por splicing alternativo de la survivina, la isoforma DeltaExón3 conserva las propiedades antiapoptóticas similares a las de la survivina (Mahotka y col., 1999), lo cual la hace ser una proteína parecida en la contribución de la inhibición de la apoptosis. Esta isoforma carece del exón 3 (118pb) y como resultado se obtiene una proteína con un corrimiento en el marco de lectura en el exón 4 y con el dominio BIR truncado, seguido por un nuevo segmento del carboxilo Terminal.

La survivina tipo y la survivina DeltaEx3 han sido las isoformas más estudiadas. La survivina DeltaEx3 a diferencia de la tipo tiene una señal de localización nucleolar (NoLS) que es capaz de translocar a la survivina- Δ Ex3 dentro del nucleolo, en donde se lleva a cabo su rápida degradación vía ubiquitina-proteasoma. Posee una señal de degradación la cual es responsable de su rápido recambio en el nucleolo dependiente de la vía proteasoma. Con esta señal la proteína es degradada mucho más rápido que la survivina; estas dos

características parecen requerirse para que esta isoforma preserve su función antiapoptótica (Song y col., 2005) y finalmente se ha visto que no actúa como una proteína pasajera cromosomal durante el ciclo celular (Song y col., 2005; Noton y col., 2005).

Todas estas características proveen mayor información para entender la función de la survivina y sus isoformas dentro de la célula cancerosa. La survivina posee un papel importante en la sobrevivencia celular, lo cual puede resultar en la resistencia a fármacos antineoplásicos. Debido a que las isoformas de la survivina se regulan dentro de la célula formando homo o heterodímeros, regulando el potencial pro o anti apoptótico, esto influiría en la respuesta celular frente a los fármacos.

Se han descrito 4 RNAs de interferencia dirigidos contra la survivina, tres de ellos se encuentran dirigidos específicamente contra el exón 1, lo que indica que inhibe tanto a la survivina tipo como a sus isoformas; mientras que el restante está dirigido al exón 3 de la survivina. En todos los casos se puede observar un aumento en la apoptosis y una disminución de la proliferación celular, aunque existen otros efectos biológicos como es la desregulación del ciclo celular en el caso de los sarcomas (Kappler y col., 2004, 2005) y de los carcinomas cervicales (Beltrani y col., 2004) o disminución en la formación de capilares y en la migración en el caso de los experimentos realizados por Coma y col., en el 2004 en células endoteliales.

Al desarrollar un RNAi dirigido contra todas las isoformas, no es posible determinar la función específica de cada variante, pues como ya se mencionó anteriormente las funciones de cada isoforma pueden asemejarse o bien ser distintas en cada proceso y respuesta celular. Sin embargo no se ha descrito ningún RNAi específico para cada una de las isoformas de la survivina.

En el presente trabajo se diseñó y clonó un RNAi específico de la survivina DeltaExón3 el cual está dirigido a una secuencia que se encuentra entre el exón2 y el exón4. Dicha secuencia encontrada fue analizada por BLAST para asegurarse que no tenga secuencias homólogas con otros genes importantes

y por consiguiente no altere su expresión. Al ser analizada la secuencia se confirmó que fuera específica del gen de interés y posteriormente se corroboró la eficiencia de este RNAi mediante análisis de RNA mensajero utilizando la técnica de PCR con la cual se aseguró la eficacia y a demás se comprobó que fuera específico y que no alterara la expresión a nivel de RNAm de las demás isoformas de la survivina, como lo son la survivina, survivina 2B y la survivina 3B.

En los ensayos de sensibilidad apoptótica realizados en células de cáncer de colon Sw48 transfectadas con el RNAi dirigido contra la survivina DeltaExón3 se utilizaron dos diferentes estímulos de muerte celular por apoptosis que activan la vía intrínseca, pero que poseen diferentes blancos moleculares; el etopósido que es un agente que activa la vía de muerte celular por daño al DNA ya que es un inhibidor de la topoisomerasa II (Yin y col., 2005) y la estaurosporina que es un potente inhibidor de las proteínas cinasas C, A y G (Gollapudi y Neet, 1997), lo cual induce muerte celular mediada por estrés celular (Tafani y col., 2001). La muerte celular inducida por estos fármacos es dependiente tanto de concentración como del tiempo de exposición, como era de esperarse la disminución en la viabilidad celular fue debido a apoptosis ya que con ambas drogas se puede apreciar que las células muestran una condensación del citoplasma y fragmentación nuclear típica de la morfología apoptótica.

La disminución en la viabilidad celular de las células de cáncer de colon Sw48 transfectadas con el RNAi dirigido contra la survivina DeltaEx3 fue estadísticamente significativa con respecto al vector vacío en aquellas células expuestas al fármaco antineoplásico etopósido sugiriendo que la falta de la isoforma DeltaExón3 en las células cancerosas le provee a dichas células cierta resistencia ante dicho fármaco en particular, el cual induce apoptosis mediante el daño al DNA. Estudios realizados en el mismo grupo de trabajo, en el cual se utilizaron células de cáncer cérvicouterino HeLa para transfectar el RNAi dirigido contra la survivina DeltaExón3 realizado en este trabajo, interesantemente mostraron una gran disminución en la liberación de citocromo c después de la exposición de las células a etopósido, así como un decremento en el total de la proteína Smac/DIABLO en células que carecen

de la survivina, mientras que con el fármaco estaurosporina las células que no poseen la survivina DeltaExón3 no se sensibilizaron frente al estímulo de muerte; estos resultados muestran que la survivina y en mayor parte la survivina DeltaExón3 es capaz de impedir la liberación de la mitocondria de Smac/DIABLO y del citocromo c después de la apoptosis inducida por estímulos genotóxicos. Además, ambas isoformas estabilizan a la proteína Smac después de su liberación de la mitocondria en el citoplasma, es estos estudios concluyen la importancia de estos efectos al proveer un posible mecanismo de las células cancerosas en la resistencia a fármacos antineoplásicos que inducen la muerte celular a través del daño al DNA (Ceballos y col., manuscrito en preparación).

Para fortalecer dicho mecanismo, existen estudios que sustentan la inducción del aumento de la survivina con varios agentes antineoplásicos; este aumento podría ser un mecanismo de resistencia a fármacos antineoplásicos intrínseco y/o adquirido de los tumores humanos (Chang y col., 2004; Ling y col., 2004; Wall y col., 2003).

En conclusión, el presente trabajo muestra que la técnica de RNAi es una herramienta muy útil para determinar la función de un gen en particular, mediante la inhibición de la expresión del gene blanco, con respecto a las estrategias convencionales presumiblemente por el hecho de que es un proceso natural.

El diseño del RNAi dirigido contra la survivina DeltaEx3 realizado en este trabajo es el primer RNAi de dicha isoforma clonado en un vector de expresión, en este caso en el plásmido pGEM-TEasy, además con la certeza de que resultó ser una inhibición a nivel postranscripcional sumamente específica del RNAm que codifica para la isoforma de interés, sin alterar la expresión de las otras variantes que son generadas por splicing alternativo, con estas características en particular se hace de este RNAi una gran herramienta para llegar a conocer las funciones específicas que lleva a cabo la survivina DeltaEx3 en procesos sumamente importantes que contribuyen en la transformación celular y posteriormente en el desarrollo del cáncer, como es el caso de la

proliferación y la muerte celular por apoptosis. Es de gran importancia conocer las funciones específicas de la survivina y de cada una de sus isoformas en diferentes tipos de cánceres para así determinar cual de las diferentes variantes es crucial inhibir y como consecuencia detener, revertir o evitar en su totalidad el desarrollo del cáncer en cualquiera de sus etapas; ya que como se mencionó anteriormente, en estudios recientes se encontró que la alta expresión de la survivina y de la survivina- Δ Ex3 se encuentra preferencialmente expresada en tumores cerebrales malignos y gliomas (Yamada y col., 2003). En cáncer de mama se reportó que tanto la survivina, la survivina- Δ Ex3 y la survivina 2B están presentes en cáncer de mama con un porcentaje de 68, 55 y 9.4% respectivamente, encontraron que las tres isoformas se detectaron en una proporción alta en carcinomas. Los RNAm de la survivina, survivina 2B y survivina- Δ Ex3 fueron detectados en niveles bajos en tejido de mama normal, comparado con los carcinomas primarios (O'Driscoll y col., 2003), finalmente en estudios realizados en cáncer cérvicouterino, la survivina y sus isoformas no fueron detectadas en tejido cervical normal, en contraste con la sobreexpresión observada en las muestras de cáncer, se encontró que en los pacientes con los tumores de adenocarcinoma más agresivos clínicamente expresaban altos niveles de survivina 2B y de survivina- Δ Ex3 (Espinosa M., 2006). Esta relación observada en los estadios más avanzados en diversos tipos de cánceres y la survivina, es de gran importancia para en un futuro saber cual de las isoformas es la que interviene en el proceso de transformación celular y desarrollo del cáncer, de tal forma que se pudieran utilizar técnicas como el RNA de interferencia como mecanismo de silenciamiento génico en el tratamiento del cáncer.

La producción de células de cáncer que carezcan de la isoforma survivina DeltaExón3 nos permite obtener información acerca de las posibles funciones que puede estar llevando a cabo dicha proteína; en este estudio se concluye que la survivina DeltaExón3 participa de manera importante en el proceso de apoptosis inducida por agentes genotóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

Adida, C., Crotty, P. L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., and Altieri, D. C. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152: 43-49.

Adida C., Recher C., Raffoux E., Daniel M., Taksin A., Rousselot P., Sigaux F., Degos L., Altieri D., Dombret H. Expression and prognosis significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 111:196-203.

Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; 96:1921–1925.

Altieri DC., Validating Survivin a Cancer Therapeutic Target. *Nature* 2003; 3: 46-54.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of The Cell. Fourth Edition. U.S.A. Garland Science 2002.

Ambrosini G., Adida C. y Altieri D. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med* 1997; 3: 917-921.

Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, Wen J, Davidoff A, Fukuzawa M, Sandler A. The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 1785–1791.

Badran A., Yoshida A., Ishikawa K., Goi T., Yamaguchi A., Ueda T. and Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene surviving. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 314: 902-907.

Bolton M.N., Lan W., Powers S.E., Mc Cleland M.L., Kuang J. y PT. 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* 2002; 13(9): 3064-3077.

Brummelkamp T. and Bernards R. New tools for functional mammalian cancer genetics. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 781-789

Caldas H., Honsey L., Altura R., Survivina 2 α : a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular Cancer* 2005; 4: 11.

Caldas H., Jiang Y., Holloway M., Fangusauro J., Mahotha C., Conway E. and Altura R. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 2005; 24: 1994-2007.

Chang, Q., Liu, Z.R., Wang, D.Y., Kumar, M., Chen, Y.B. and Qin, R.Y. Survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 415-418.

Chantalat L., Skoufias D. A. Kleman J. P. Jung B., Dideberg O. y Margolis R.L. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell* 2000; 6(1): 183-189.

Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.

Cohen, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16.

Crook, N.E., R.J. Clem, and L.K. Miller. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with zinc finger-like motif. *J Virol* 1993; 67: 2168-2174.

D'Amico TA., Aloia TA., Moore MB., et al. Predicting the sites of metastases from lung cancer using molecular biologic markers. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 1144-1148.

Déctor M.A., Arias C.F., Interferencia por ARN: un sistema de defensa primitivo. *Cencia* 2004; 25-36.

Delhalle S., Duvoix A., Schnekenburger M., Morceau F., Dicato M. y Diederich M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann Y Acad Sci* 2003; 1010: 1-8.

Deveraux Quinn L. and Reed John C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes and Development* 1999; 13: 239-252.

Espinosa M, Cantú C., Herrera N., Lopez C., De la Garza J., Maldonado V., Melendez-Zajgla. Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 45.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-2216.

Fangusauro J., Jiang Y., Holloway M., Caldas H., Singh V., Hayes J. Y Altura R. Survivin, Survivin-2B y Survivin-deltaEx3 expression in medulloblastoma: biologic markers of tumor morphology and clinical outcome. *British Journal of Cancer* 2005; 92: 359-365.

Fletcher S. Genesis and apoptosis. *British Med J* 1994; 309: 542-543.

Gassmann R., Carvalho A., Henzing AJ., Ruchaud S., Hudson DF., Honda R., Nigg EA., Gerloff DL. y Earnshaw WC. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol* 2004; 166: 179-191.

Gollapudi, L. and Neet, K.E. Different mechanisms for inhibition of cell proliferation via cell cycle proteins in PC12 cells by nerve growth factor and staurosporine. *J Neurosci Res* 1997; 49: 461-474.

Grabowski P., Kuhnel T., Muhr-Wilkenshoff F., et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2003; 88: 115-119.

Gross A., et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999; 274: 1156-1163.

a) Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1076–1081.

b) Grossman D., McNiff J., Li F., Altieri D. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab invest* 1999; 79: 1121-1126.

Hannon G.J. RNA interference. *Nature* 2002; 418(6894): 244-251.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.

Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognosis factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000; 19: 617–623.

Ito T., Shiraki K., Sugimoto K., Yamanaka T., Fujikawa K., Ito M., Takase K., Moriyama M., Kawano H., Hayashida M., Nakano T., Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-1085.

Jacobson MD., Meil M., Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354.

Jonson M. y Howerth W. Survivin: a Bifunctional Inhibitor of Apoptosis Protein. *Vet pathol* 2004; 41: 599-607.

Kallio M.J., Y Nieminen M. Y Eriksson J.E. Human inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit. *FASEB J.* 2001; 15(14): 2721-2723.

Kasof GM y Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276(5): 3238–3246.

Kato J., Kinwabara Y., Mitani M., Shinoda N., Sato A., Toyama T., Mitsui A., Nishiwaki T., Moriyama S., Kudo J., Fujji Y. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001; 20;95(2): 92-95.

Kawasaki H., Altieri D., Lu C., Toyoda M., Tenjo T., Tanigawa N, Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074.

Kennedy SM., O´Driscoll L., Purcell R., Fitz-Simons N., McDermott EW., Hill AD., O´Higgins NJ., Parkinson M., Linehan R., Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 1077-1083.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.

Ku JH, Kwak C, Lee HS, Park HK, Lee E, Lee SE. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2004, 171: 631–635.

Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T y Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 1457–1462.

Kuhnel F., Zender L., Paul Y., et al. NF-kappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 2000; 275: 6421-6427.

LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259.

Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky D, Shroyer AL, McGregor JA, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10:134-138.

Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC y Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 461-466.

Li F., Ambrosini G., Chu E.Y., Plescia J., Tognin S., Marchisio P.C. y Altieri D.C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396(6711): 580-584.

Li F., Xie M., Yang D., Deng R., Wan Y. y Yan B. The expression of antiapoptotic protein survivin is transcriptionally upregulated by DEC1 primarily through multiple sp1 binding sites in the proximal promoter. *Oncogene* 2006; 1-11.

Li F., Altieri DC. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res* 1999; 59(13): 3143-3151.

Ling, X., Bernacki, R.J., Brattain, M.G. and Li, F. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest. *J Biol Chem* 2004; 279: 15196-15203.

Liston P, Fong W.G., Kelly NL., Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW y Korneluk RG. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti- Caspase activity. *Nat Cell Biol* 2001;3: 128-133.

Liston P, Fong W.G., Korneluk R. G., The inhibitors of apoptosis: is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003; 22: 8568-8580.

Lu C., Altieri D., Tanigawa N. Expresión of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812.

Mahotka C., Liebmann J., Wenzel M., Suschek CV., Schmitt M., Gabbert HE. and Gerharz CD. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death and Differentiation* 2002; 9: 1334-1342.

Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, HE., and Gerharz, CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Research* 1999; 59(24): 6097-6102.

Martinez A., Bellosillo B., Bosh F., et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 2004; 164: 501-510.

Mei ZZ., Dong Y., Sun ZX. Effects to HeLa Cells of the inhibition of Survivin by Antisense RNA. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 2001; 33(5): 547-551.

Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel antiapoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2100.

Meng H., Lu C., Mabuchi H y Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. *Cancer Letters* 2004; 216: 147-155.

Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001; 108: 981-990.

Miller L. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in Cell Biology* 1999; 9: 323-328.

Guo M. y Hay B. Cell proliferation and apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 1999; 11: 745-752.

Monzo M., Rosell R., Felip E., Astudillo J., Sanchez JJ., Maestre J., Martin C., Font A., Barnadas A., Abad A. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2100-2104.

Moss, E.G. RNA interference: it's a small RNA world. *Current Biology* 2001; 11, R772-R775.

Muzio L., Staibano S., Pannone G., Mignogna MD., Mariggio A., Salvatore G., Chieffi P., Tramontano D., De Rosa G., Altieri DC. Expresión of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001; 70: 249-254.

Noton E., Colnaghi R., Tate S., Starck C., Carvalho A., Ferrigno P., Wheatley S. Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *JBC* 2005; 13; 281(2): 1286-1295.

O'Connor D.S., *et al.* Regulation of apoptosis at cell division by p34 cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 13103-13107.

O'Connor DS, Wall NR, Porter AC and Altieri DC. A p34 (cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2: 43–54.

O'Driscoll L., Linehan R., Kennedy SM., Cronin D., Purcell R., Glynn S., McDermott EW., Hill AD., O'Higgins N., Parkinson M., Clynes M. Lack of prognosis significance of survivin, survivin- Δ Ex3, survivin 2B, galectin, bag-1, bax-alpha, and MRP-1 mRNAs in breast cancer. *Cancer Lett* 2003; 201: 225-236.

Okada E., Murai Y., Matsui K., et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001; 163: 109-116.

Olie RA, Simões-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000; 60: 2805–2809.

Pennati M, Colella G, Folini M, Citti L, Daidone MG, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated attenuation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *J Clin Invest* 2002; 109: 285–286.

Pennati M, Binda M, Colella G, Folini M, Citti L, Villa R, Daidone MG, Zaffaroni N. Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 648–654.

Pennati M, Binda M, De Cesare M, Pratesi G, Folini M, Citti L, Daidone MG, Zunino F, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated down-regulation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to topotecan *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1129–1136.

Ponnelle T., Chapusot ., Martin L., Bouvier M., Plenchette S., Faivre J., Solary E, Piard F. Cellular localisation of Survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 504–510.

Riedl S.J., Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2004; 5: 897-907.

Rohayem J., Diestelkoetter P., Weigle B., Oehmichen A., Schmitz M., Mehlhorn J., Conrad K. y Rieber P. Antibody Response to the Tumor-associated Inhibitor of Apoptosis protein Survivin in Cancer Patients. *Cancer research* 2000; 60: 1815-1817.

Ryan B., O'Donovan N., Browne B., O'Shea C., Crown J., Hill ADK., Mcdernott E., O'Higgins N. and Duffy MJ. Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin- Δ Ex3 in breast cancer. *British Journal of Cancer* 2005; 92: 120-124.

Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *Eu J Surg Oncol* 2003; 29: 379-382.

Sánchez-Torres L.E., Diosdado F., Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Téc Pecu Méx* 2003; 41(1): 49-62.

Satoh K., Kaneko K., Hirota M., Massamune A., Satoh A., Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001; 92: 271-278.

Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ () Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 305-310.

Shinohara E., Gonzalez A., Massion P., Chen H., Li M., et al. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2005; 103(8): 1685-1692.

Song Z. and Wu M. Identification of a novel nucleolar localization signal and degradation signal in Survivina-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation. *Oncogene* 2005; 1-12.

Swana H., Grossman D., Anthony J., Weiss R., Altieri D. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 452-453.

Tafari, M., Minchenko, D.A., Serroni, A. and Farber, J.L. Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res* 2001; 61: 2459-2466.

Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. IAP family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320.

Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M., Tanigawa N. Expresión of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134.

Trieb K., Lehner R., Stulnig T., Sulzbacher I., Shroyer KR. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 379-382.

Tu SP, Cui JT, Liston P, Huajiang X, Xu R, Lin MC, Zhu YB, Zou B, Ng SS, Jiang SH, Xia HH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong BC. Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology* 2005; 128: 361-375.

Twomey C., McCarthy JV. Pathways of apoptosis and importance in development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005; 9(2): 345-359.

Vagnarelli P., William C., Earnshaw C. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 2004; 113: 211-222.

Verdecia M.A., Huang H., Dutil E., Kaiser D.A. Hunter T. y Noel J.P. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000; 7(7): 602-608.

Wall, N.R., O'Connor, D.S., Plescia, J., Pommier, Y. and Altieri, D.C. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63: 230-235.

Yagihashi A., Asanuma K., Nakamura M., Araya J., Mano Y., Torigoe T., Kobayashi D., Watanabe N. detection of Anti-Survivin Antibody in Gastrointestinal Cance Patients. *Clinical Chemistry* 2001; 47(9):1729-1731.

Yamada Y., Kuroiwa T., Nakagawa T., et al. Transcriptional expresión of survivin and its silice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg* 2003; 99: 738-745.

Yoshida H., Ishiko O., Sumi T., Matsumoto Y., Ogita S. Survivin, bcl-2 and matrix metalloproteinase-2 enhance progression of clear cell-and serous-type ovarian carcionamas. *Int J Oncol* 2001; 19: 537-542.

Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, Pilotti S, Zunino F y Daidone MG. Expression of anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1406–1412.

Zhao J., Tenev T., Martins L.M., Downward J. Y Lemoine N.R. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 2000; 113 Pt 23: 4363-4371.

ANEXO I

Abreviaturas

DNA	Ácido desoxiribonucleico
cDNA	ADN complementario
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _{hn}	ARN Heterogéneo Nuclear
RNA _{dc}	ARN de doble cadena
RNA _i	ARN de interferencia
ATP	Adenosín Trifosfato
Aa	Aminoácidos
Ala	Alanina
Apaf 1	Factor Apoptótico 1 activador de proteasas
BIR	Región de IAP en Baculovirus
BIRPS	Proteínas que contienen BIR
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
Cdc	Ciclina Dependiente de Cinasa
Cys(84)	Cisteína 84
DISC	Complejo de Señalización de Inducción de Muerte
DED	Dominio Efecto de Muerte
DIABLO	Proteína de Unión a IAP con Bajo PI
dNTPs	Deoxinucleótidos
FADD	Proteína Asociada a Fas con Dominio de Muerte
Fase G ₂	Fase "gap" o intervalo 2

Fase M	Fase Mitosis
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenada
GFP	Proteína Verde Fluorescente
IAP	Proteínas Inhibidoras de Apoptosis
ILP	Proteína como IAP
INCENP	Proteína Interna del Centrómero
FasL	Ligando de Fas
ML-IAP	IAP en Melanoma
NAIP	Proteína inhibitoria de Apoptosis Neuronal
NBL	Neuroblastoma
NF- κ B	Factor Nuclear- κ B
Nt	Nucleótidos
OD ₆₀₀	Densidad Óptica
PARP	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
p34	Fósforo 34
RdRp	RNA polimerasa dependiente de ARN
RT	Reversotranscriptasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rb	Retinoblastoma
RING	Anillo de Dedo de Zinc
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN
siRNAs	Pequeños RNA de interferencia

Smac	Segundo Activador Mitocondrial de Caspasas
Thr 34	Treonina 34
TNFR	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral

Abreviaturas de Medidas

G	Gramos
Mg	Miligramos
µg	Microgramos
Ng	Nanogramos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
M	Moles
mM	Milimoles
µM	Micromoles
nM	Nanomoles
picoM	Picomoles
Pb	Pares de bases
h	Horas
Min	Minutos