



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“PAPEL DE LA SURVIVINA DELTAEX3 EN LA
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS
DE CÁNCER”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ALEJANDRA BEATRIZ CERVANTES
GARDUÑO

TUTORA: M. EN C. MAGALI ESPINOSA
CASTILLA

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno.
Cervantes
Garduño
Alejandra Beatriz
56 37 44 75
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
098011636
2. Datos del tutor
M en C
Magali
Espinosa
Castilla
3. Datos del sinodal 1
Dr
Luis Felipe
Jiménez
García
4. Datos del sinodal 2
Dra
Patricia
Ramos
Morales
5. Datos del sinodal 3
Bio
Juan Carlos
Gallardo
Pérez
6. Datos del sinodal 4
Biol
Varenka
Martínez
Toledo
7. Datos del trabajo escrito
"Papel de la survivina DeltaEx3 en la cinética de crecimiento de células de cáncer"
52 p
2007

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Cáncer	2
Apoptosis	3
Vías apoptóticas	4
IAPs	6
Survivina	7
Survivina y ciclo celular	8
Survivina y cáncer	8
Isoformas de la survivina	10
Isoformas de la survivina y cáncer	12
Survivina Delta Ex3	15
Esferoides	17
RNAi de Interferencia	19
Hipótesis	22
Objetivos	23
General	23
Específicos	23
Metodología	24
Líneas celulares	24
Cultivo de monocapa	24
Cultivo de esferoides	24
Criopreservación	24
Transfección	24
Ensayo de clonogenicidad	25
Extracción de RNA total	25
RT-PCR	25
Análisis estadístico	27
Resultados	28
Cultivo de esferoides	28
<i>Expresión de las isoformas de la survivina en la línea celular HEK293 en monocapa y en esferoide.</i>	30
Inhibición de la survivina en células HEK293 transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3	32
Capacidad de crecimiento de las células transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3	33
Capacidad de clonogenicidad de las células transfectadas con el RNAi de la survivina DeltaEx3	34
Discusión y Conclusiones	35
Bibliografía	40
Anexos	50

RESUMEN

La apoptosis es un proceso conservado evolutivamente y es necesario para mantener la homeostasis celular en los tejidos. La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción celular, el cual se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos característicos. Estos cambios son regulados positivamente por la familia de las caspasas y negativamente por dos familias principales: Bcl2 y las IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis).

La survivina es una IAP que está implicada en la regulación del ciclo celular y protege a las células de la apoptosis inhibiendo la actividad de la caspasa 9. Se han reportado 5 isoformas de la survivina. La survivina-DeltaEx3, es una de las isoformas que conserva el potencial antiapoptótico similar al de la survivina tipo. La localización celular de la survivina-DeltaEx3 es nuclear y posiblemente pertenezca a una población mitocondrial que participa en la inhibición de la apoptosis. En cuanto al cáncer, esta proteína se ha visto sobreexpresada, en los estadios más avanzados del tumor.

El presente trabajo mostró el papel de la survivina-DeltaEx3 en la cinética de crecimiento de células de cáncer. Se mostró que la inhibición específica de la survivina-DeltaEx3 modifica el crecimiento en el cultivo de esferoides. También se observó que la inhibición de esta proteína aumenta la capacidad de clonogenicidad.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

La palabra cáncer se utiliza para la descripción de un grupo de estados patológicos heterogéneos que tienen en común la multiplicación anómala de las células con invasión en los tejidos circundantes (Nogelstein *et al.*, 1992). Una célula normal presenta una morfología definida y encaja a la perfección en el entorno que la rodea, responde a señales ambientales y se divide sólo cuando el balance de señales estimuladoras e inhibidoras precedentes del exterior favorece la división celular. Este proceso está sometido a un riesgo permanente de mutaciones genéticas: cambios aleatorios que alteran las moléculas reguladoras de la célula. Una sola mutación puede hacer que la célula dañada sea menos receptiva a los mensajes externos (Webster *et al.*, 1995).

La acumulación de daños genéticos puede hacer que una célula no responda a las señales externas y manifieste alteraciones fisiológicas, que en su conjunto induzcan al crecimiento de células malignas. Entre las capacidades que adquieren las células de cáncer se encuentran: la insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, el potencial para dividirse ilimitadamente, evasión de la apoptosis, inducción de la angiogénesis y la habilidad de metástasis e invasión de tejido sano (Hanahan y Weinberg, 2000).

Apoptosis

La apoptosis es un proceso altamente conservado, implicado en el desarrollo embrionario y el mantenimiento en la homeostasis celular normal en todos los tejidos. La apoptosis es un proceso activo de autodestrucción celular genéticamente programado. Este proceso puede ser iniciado por un gran número de estímulos, como la presencia o ausencia de factores de crecimiento, alteraciones en el ciclo celular, daño al DNA y estrés (Nika y Stanley, 2004).

Durante la apoptosis se observan en las células cambios morfológicos y bioquímicos característicos. Entre los primeros cambios morfológicos se encuentra la pérdida de los contactos celulares con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión y las estructuras celulares especializadas. Otros cambios en las células apoptóticas son: la condensación del citoplasma, la pérdida del volumen celular y la formación de vesículas asociadas a la pérdida de líquido intracelular. En el núcleo hay condensación de la cromatina, seguida de la invaginación de ésta y del resto de los organelos celulares en la membrana celular y finalmente la formación de vesículas denominadas cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por las células aledañas o fagocitos profesionales, impidiendo que las moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres entre las células (Sevill J. *et al.*, 1992).

Entre los cambios bioquímicos se encuentran: la translocación de la fosfatidilserina de la capa interna de la membrana plasmática hacia la capa externa, cambios en la permeabilidad y la composición de la membrana plasmática; de la misma manera la permeabilidad mitocondrial es afectada, disminuyendo su potencial transmembranal (Shwartzman y Cidlowski, 1993), y la activación de endonucleasas que cortan el DNA en fragmentos internucleosomales (Wyllie H. 1980; Enari M. *et al.*, 1998).

Vías apoptóticas

Los cambios morfológicos y bioquímicos que se observan en una célula durante la apoptosis, son regulados positivamente por una familia de cisteín-proteasas llamadas caspasas. Las caspasas son proteínas que se activan por proteólisis y unión a múltiples sustratos y son consideradas las ejecutoras centrales de la apoptosis (Tomislav *et al.*, 1998).

Se han identificado dos vías principales de apoptosis en mamíferos. La vía extrínseca y la vía intrínseca (Fig. 1). La primera vía es activada por la unión de ligandos a los receptores de muerte, continuando con el reclutamiento del Complejo de Señalización de Inducción de Muerte (DISC) en el dominio citoplásmico de Fas. Los adaptadores proteicos de DISC reclutan a la procaspasa 8, que es entonces activada. La caspasa 8 activada, activa a la procaspasa 3 y su activación conduce finalmente a la muerte de la célula (Yuan J, 1997).

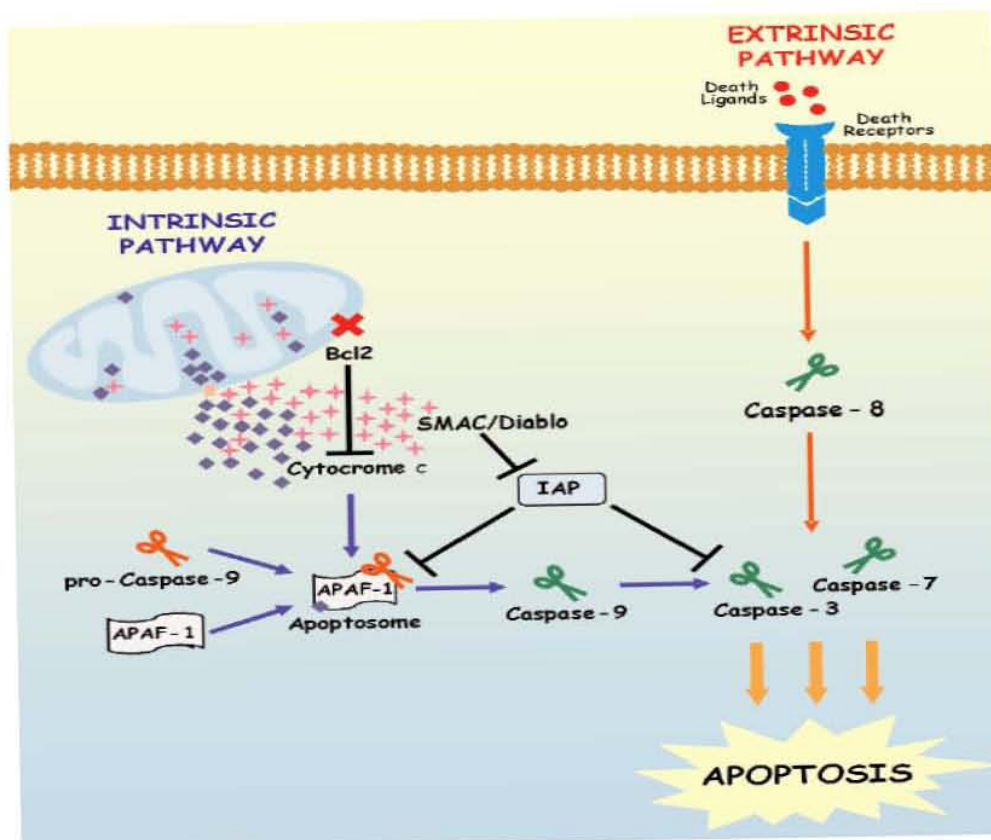


Figura 1. Las dos principales vías apoptóticas en células humanas. La vía extrínseca (mediada por receptores de muerte) y la vía intrínseca (mitocondrial) (Zaffaroni *et al.*, 2005).

En la vía intrínseca está involucrada la mitocondria, la cual responde a señales pro-apoptóticas, liberando al citocromo *c*. Una vez en el citosol, el citocromo *c* se une al factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (Apaf 1) y a la procaspasa 9, formando el apoptosoma, el cual conduce a la activación de la caspasa 9 e inicia la activación de la cascada de proteasas (Cryns *et al.*, 1999).

La apoptosis es regulada negativamente por proteínas de la familia Bcl-2 y por la familia de las IAPs (Adams y Cory, 1998).

IAPs

Esta familia de proteínas está conservada evolutivamente, encontrándose en organismos tales como: virus, levaduras, nemátodos, insectos y mamíferos. Las IAPs se caracterizan por la presencia de un dominio BIR (Repeticiones de IAPs Baculovirales), (Uren *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999). Los BIRs son esenciales para las propiedades antiapoptóticas de las IAPs, en muchos casos a este dominio se le atribuye la unión e inhibición de las caspasas (Duckett *et al.*, 1998).

Algunas IAPs tienen un segundo motivo que une zinc conocido como dominio RING (Joazeiro *et al.*, 2000). Este dominio se ubica en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Las IAPs que tienen este dominio pueden catalizar la degradación de ellas mismas y de otras proteínas mediante la ubiquitinación (Guy y Colin, 2002).

Hasta ahora se han identificado ocho IAPs en humanos: XIAP, ILP-2, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP, N-IAP, Survivina y Apollon (Figura 2). Solo cinco de ellas contienen un dominio RING (Joazeiro *et al.*, 1999) y dos de ellas poseen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) (Hoffman *et al.*, 1997).

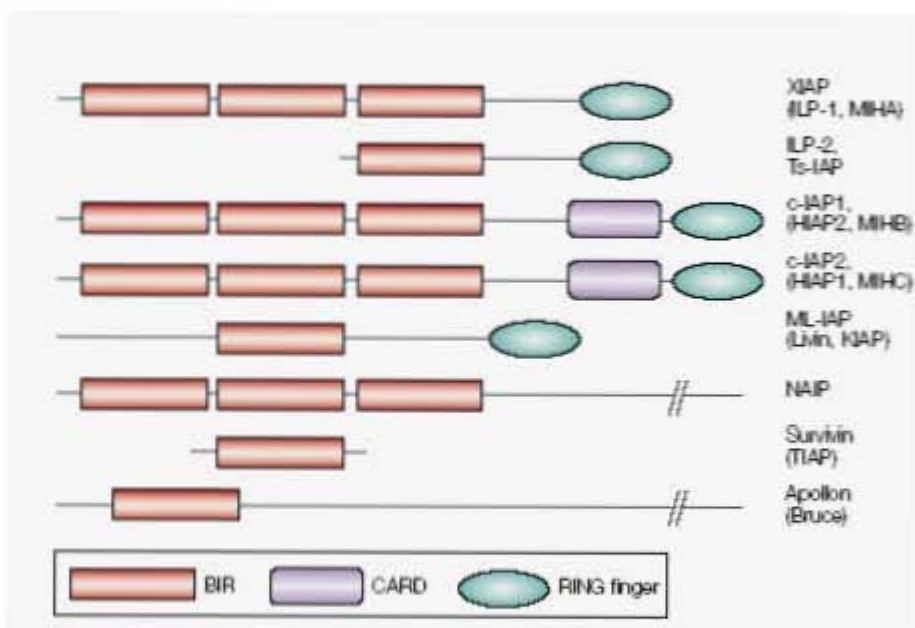


Figura 2. Estructura de la familia IAPs en mamíferos (Guy *et al.*, 2002).

Survivina

Ambrosini y colaboradores, identificaron a un nuevo miembro de la familia de las IAPs, la survivina (Ambrosini *et al.*, 1997). Estructuralmente contiene un dominio BIR, un extremo carboxilo terminal alfa-helicoidal y no contiene el dominio RING (Ambrosini *et al.*, 1997). El gen de la survivina humana está localizado en el cromosoma 17, banda q25 (Ambrosini *et al.*, 1998) y en ratón en el cromosoma 11, banda E2 (Li y Altieri, 1999).

La survivina está implicada en la regulación del ciclo celular, expresándose principalmente en la fase G2-M (Li *et al.*, 1998). La survivina protege a las células de apoptosis inhibiendo la actividad de la caspasa 9 en la vía intrínseca (Caldas *et al.*, 2005 a). La survivina se expresa en órganos fetales y embriones, pero no en tejido normal diferenciado, con excepción del timo, del epitelio basal de colon (Altieri *et al.*, 2003), de células epiteliales y células neuronales troncales durante la angiogénesis (O'Connor *et al.*, 2000). Se ha reportado que existen altos niveles de expresión de la survivina en la mayoría de los tumores humanos incluyendo cáncer de pulmón (Monzo *et al.*, 1999), mama (Tanaka *et al.*, 2000), colón (Kawasaki *et al.*, 1998), estómago (Lu *et al.*, 1998), esófago (Kato *et al.*, 2001), páncreas (Satoh *et al.*, 2001), hígado (Ito *et al.*, 2000), cérvico-uterino (Saiton *et al.*, 1999), ovario (Yoshiko *et al.*, 2001), linfoma de no-Hodgkin (Ambrosini *et al.*, 1997), leucemias (Adida *et al.*, 2000), neuroblastoma (Adida *et al.*, 1998 y Hoffman *et al.*, 2000), sarcomas de tejido suave (Kappler *et al.*, 2001), melanomas (Grossman *et al.*, 1999) y otros cánceres de piel (Grossman *et al.*, 1999 y Altieri *et al.*, 2003).

Survivina y el ciclo celular

La survivina además de participar en la apoptosis, tiene un importante papel en la regulación durante la fase G2-M, seguida de una rápida disminución en la fase G1. Durante la mitosis la survivina está localizada en diferentes componentes del aparato mitótico. Se encuentra en los centrómeros en la profase, en los cinetocoros en la metafase, en los husos mitóticos en la anafase y en el cuerpo medio durante la citocinesis (Uren *et al.*, 2000 y Wheatley *et al.*, 2001). La survivina está asociada a la cinasa Aurora B, dirigiendo a los cinetocoros de los cromosomas en metafase (Chen *et al.*, 2003). El complejo Aurora B/survivina/INCENP interviene en la condensación y segregación de los cromosomas, al final de la mitosis, para finalizar la citocinesis (Uren *et al.*, 2000).

Survivina y cáncer

La elevada expresión de la survivina en tumores correlaciona con fenotipos clínicos más agresivos e invasivos, con mal pronóstico y la disminución a la respuesta a agentes quimioterapéuticos (Adida *et al.*, 1998 y 2000; Islam *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 1998; Monzo *et al.*, 1999; Sarela *et al.*, 2001; Swana *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000).

La alta expresión de la survivina en los pacientes con cáncer, se ha correlacionado con una tasa de supervivencia más baja, comparada con aquellos que tienen una baja expresión o ausencia de la survivina. Como ejemplo de lo anterior se puede mencionar el caso del carcinoma celular escamoso de esófago, en donde la tasa de supervivencia de cinco años en los pacientes con altos niveles de survivina fue

significativamente más pobre (4.1%), que de aquellos que tuvieron bajos niveles de survivina (46.8%). Se han reportado resultados semejantes en pacientes con linfoma de células B, largas y difusas (Adida *et al.*, 2000), carcinoma colorectal (Kawasaki *et al.*, 1998; Sarela *et al.*, 2001), carcinoma hepatocelular (Ikeguchi *et al.*, 2002) y en adenocarcinoma de pulmón (Ikehara *et al.*, 2002).

Debido a que la survivina se expresa en muchos tipos de cáncer y es indetectable en tejido adulto normal, se ha propuesto que la survivina pueda servir para el diagnóstico de varios tipos de cáncer (Rohayem *et al.*, 2000, Andersen *et al.*, 2000, Adida *et al.*, 2000, Johnson y Howert, 2004). Se han realizado varios estudios tratando de identificar a la survivina en pacientes con cáncer, un ejemplo de estos estudios es el uso de anticuerpos en muestras de pacientes. En el 2000, Royahem y colaboradores, detectaron anticuerpos dirigidos contra la survivina en el suero de pacientes con cáncer de pulmón, cáncer colorectal y cáncer gastrointestinal (Royahem *et al.*, 2000).

Isoformas de survivina

Se han identificado diferentes isoformas de la survivina generadas por "splicing" alternativo (Fig. 3). Estas isoformas son: la *survivina tipo* formada por cuatro exones; la *survivina-2B* la cual es generada por la inserción del exón-2 B; la *survivina-3B* que es resultado de la inserción del exon-3B (Badram *et al.*, 2004); la *survivina-DeltaEx3* que resulta de la perdida del exón 3 (Mahotka *et al.*, 1999), y la *survivina-2 α* que esta formado por el exón 1 y el exón 2 (Caldas *et al.* 2005 b).

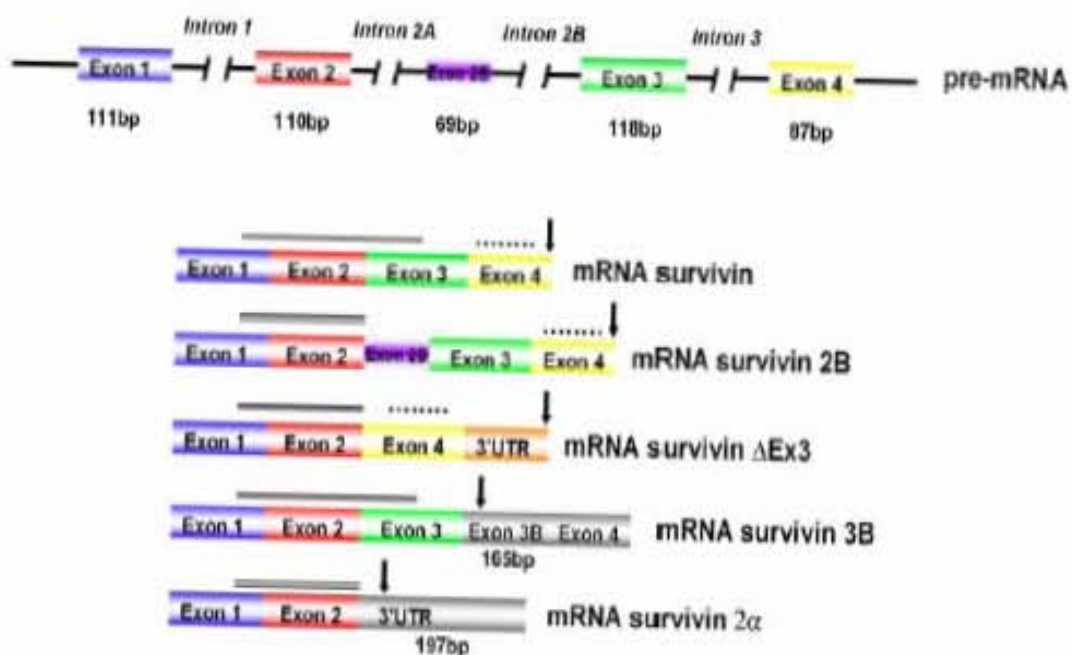


Figura 3. El pre-RNAm genera cinco transcritos de RNAm maduro. Las cajas representan los exones, con sus tamaños indicados debajo. La línea negra indica el codón de término, la línea puntuada indica el dominio cola enrollada y la línea gris representa al dominio BIR (Caldas *et al.*, 2005).

Además de sus diferencias estructurales cada una de las isoformas tiene localizaciones y funciones diferentes (Caldas *et al.*, 2005 a). La localización subcelular de la survivina tipo y la survivina-2B es predominantemente citoplasmática, mientras que la localización de la survivina-DeltaEx3 es predominantemente nuclear (Caldas *et al.*, 2005 a). Estudios de microscopía confocal muestran una población subcelular localizada en la zona "ruffle" de la membrana (Caldas *et al.*, 2006). La survivina-2 α se localiza tanto en citoplasma como en el núcleo (Caldas *et al.*, 2005 b) y la survivina-3B tiene una localización citoplasmática (Knauer *et al.*, 2007).

Las isoformas de la survivina presentan diversos roles apoptóticos en la célula. La survivina tipo y la survivina-DeltaEx3, aunque tiene el dominio BIR truncado, tienen un potencial antiapoptótico (Mahotka *et al.*, 1999 y 2002). La survivina-2B tiene un potencial antiapoptótico reducido y se ha sugerido que la survivina-2B puede ser un antagonista natural de la survivina tipo y de la survivina-DeltaEx3, regulando la actividad de estas dos isoformas antiapoptóticas (Mahotka *et al.*, 1999), Caldas en el 2005 sugiere que la survivina-2 α interactúa directamente con la survivina tipo atenuando la actividad antiapoptótica de esta última (Caldas *et al.*, 2005 b). Recientemente se reportó que la survivina-3B tiene una actividad citoprotectiva (Knauer *et al.*, 2007).

Reportes previos demuestran mediante análisis de cristalografía que la survivina tipo puede dimerizarse mediante sus dominios BIRs formando heterodímeros (Verdecia *et al.*, 2000). La survivina tipo forma heterodímeros con la survivina-2B o la survivina-DeltaEx3 para modular su papel en el control de la mitosis y en la apoptosis (Li, 2003). La formación de estos heterodímeros sucede en la mitocondria y posiblemente sean requeridos para el reclutamiento de los complejos para la inducción de apoptosis dependiente de la mitocondria (Caldas *et al.*, 2005 a).

Isoformas de la survivina y Cáncer

La expresión de las isoformas de survivina se ha estudiado en diversos tipos de cáncer, encontrándose una correlación con los estadios del tumor. Islam y colaboradores en el 2000, analizaron la presencia de la survivina tipo y de la survivina-2B en neuroblastoma, encontrando que los altos niveles de expresión del RNAm de la survivina tipo están asociados a los estadios avanzados de neuroblastoma, en contraste, la expresión de la survivina-2B se asoció con los neuroblastomas de pronóstico favorable (Islam *et al.*, 2000).

Estudios en carcinoma renal, mostraron que todas las muestras analizadas expresaron survivina-DeltaEx3, survivina-2B y survivina tipo, siendo la última el transcrito dominante. En los estadios más avanzados se detectó una mayor presencia de la survivina tipo y de la survivina-DeltaEx3, mientras que de la survivina-2B se detectaron bajos niveles. Así mismo encontraron una relación de la survivina tipo y la survivina-DeltaEx3 con cánceres más agresivos (Mahotka *et al.*, 2002).

Se encontró un patrón parecido al anterior en la expresión de las isoformas en un análisis en carcinomas gástricos de diferentes subtipos histológicos, grados y estadios, mostraron que mientras que la survivina tipo y la survivina-DeltaEx3

permanecen inalterables, existe un decremento de la expresión de survivina-2B, dependiente del estadio (Krieg *et al.*, 2002).

Como se mencionó estudios en: neuroblastoma, carcinoma renal y carcinomas gástricos muestran que los niveles altos de expresión de la survivina tipo y la survivina-DeltaEx3, están presentes en los estadios más avanzados y correlacionan con los tipos de cáncer más agresivos. En contraste con la survivina-2B que presenta bajos niveles de expresión en los estadios avanzados y está relacionada con el pronóstico favorable.

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

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

Tipo de cáncer	Isoforma	Notas	
Carcinoma renal	Survivina-DeltaEx3 Survivina-2B	Isoformas capaces de regular la respuesta al estímulo proapoptótico	Mahotka, 1999
Neuroblastoma	Survivina-2B Survivina tipo	Estadios avanzados alta expresión de mRNA de survivina tipo. Expresión de survivina-2B en casos favorables	Islam, 2000
Leucemia de células T en adulto.	Survivina tipo	Expresión en todos los casos. En células normales no se expresa.	Kamihira, 2001
Gástrico	Survivina tipo	Se expresa en todas las líneas de cáncer y muestras de pacientes (68%). Expresión en la mucosa normal asociada a la presencia de <i>H. pylori</i> .	Yu, 2002
Vejiga	Survivina tipo	Se expresa en 30% de los casos y no hay una relación entre la expresión de la survivina y la recaída de los pacientes.	Gazzaniga, 2003
Páncreas, carcinoma	Survivina tipo	Expresión de altos niveles en células	Yang, 2003

de colón y mama		tumorales.	
Leucemia aguda mielodisplástica	Survivina-3B	Se encontró la expresión de la survivina-3B en muestras de pacientes.	Badran, 2004
Gástrico	Survivina tipo Survivina-2B Survivina-DeltaEx3	Expresión en todos los casos de las tres isoformas. La expresión de survivina tipo y la survivina-DeltaEx3 esta relacionada con el estadio, el tipo histológico y la invasión.	Meng, 2004
Mama	Survivina tipo Survivina-2B Survivina-DeltaEx3	Expresión de survivina tipo en 93.6% de los carcinomas, 100% en metástasis de axila, 22.7% tejido normal. Altos niveles de expresión de survivina-DeltaEx3 y survivina-2B en metástasis nodal.	Ryan, 2005
Ovario	Survivina tipo	La localización de la survivina tipo es predominantemente nuclear en tumores primarios y predominantemente citoplasmática en estadios avanzados.	Fernandina, 2005
Meduloblastoma	Survivina tipo	Correlación con altos niveles de expresión de la survivina tipo y mal pronóstico. Asociación entre el porcentaje positivo de survivina tipo y el subtipo histológico.	Fangusaro, 2005
Colorectal	Survivina tipo Survivina-2B Survivina-DeltaEx3	Alta expresión de la survivina-2B y la survivina tipo en tumores. No hay diferencias en la expresión de survivina-DeltaEx3 y la survivina tipo en tumores respecto a tejido normal.	Suga, 2005
Sarcoma de tejido suave	Survivina tipo Survivina-2B Survivina-DeltaEx3	Elevada expresión de las tres isoformas correlaciona con el mal pronóstico. La sobreexpresión de la survivina-DeltaEx3 esta asociada a estadios más avanzados.	Taubert, 2005
Cérvicouterino	Survivina tipo Survivina-2B Survivina-DeltaEx3	Expresión en muestras de cáncer de las tres isoformas. Altos niveles de expresión de Survivina-2B y la survivina-DeltaEx3 en adenocarcinomas.	Espinosa, 2006
Tumores pediátricos	Survivina tipo Survivina-2B	Expresión de las tres isoformas. La survivina tipo es expresada de forma dominante y su expresión	Fangusauro, 2006

	Survivina-DeltaEx3	está asociada con el desarrollo del tumor.	
Queratinocitos	Survivina tipo	La survivina tipo es altamente expresada.	Marconi, 2006
Leucemia (pediátrica)	Survivina tipo Survivina-2B	La survivina tipo y la survivina-2B colocalizan en el citoplasma.	Wutting, 2007

Survivina DeltaEx3

La survivina-DeltaEx3 carece del exón 3, la eliminación de este exón resulta en un marco de lectura diferente y con un dominio BIR truncado. A pesar de estas modificaciones estructurales, la survivina-DeltaEx3 tiene un potencial antiapoptótico similar al de la survivina tipo (Mahotka *et al.*, 1999). La localización celular de la survivina-DeltaEx3 es nuclear y debido a que posee una señal de localización mitocondrial es posible que forme parte del pool subcelular mitocondrial. Este pool participa en la inhibición de apoptosis vía mitocondrial (Mahotka *et al.*, 2002).

La survivina DeltaEx3 tiene una señal de localización nucleolar (NoLS), la cual permite que esta isoforma sea capaz de trasladarse dentro del nucléolo. Además tiene una señal de degradación que permite su degradación en el nucléolo a través de la vía ubiquin-proteosoma (Song *et al.*, 2005). Esta degradación es más rápida que la de survivina tipo, por lo que puede explicar por que la survivina-DeltaEx3 no actúa como una proteína pasajera cromosomal (Song *et al.*, 2005; Noton *et al.*, 2005). Tanto la señal de localización nucleolar como la señal de degradación parecen ser necesarias para que la survivina-DeltaEx3 mantenga sus funciones antiapoptóticas (Song *et al.*, 2005).

Diversos análisis en la expresión de la survivina-DeltaEx3 en tejido normal y en tejido de tumor demuestran que esta isoforma está asociada a células vasculares endoteliales y se localiza en el tejido endotelial (Trand *et al.*, 1999). La survivina-DeltaEx3 está implicada como un mediador directo durante la angiogénesis y su ausencia resulta en un gran daño en la invasión de células endoteliales y la migración. Esta isoforma está altamente expresada en células del endotelio vascular, y es requerida *in vivo* para la invasión de células endoteliales (Caldas *et al.*, 2007).

Uno de los mecanismos por el que la survivina-DeltaEx3 inhibe la apoptosis es inducida por TNF α actuando como un adaptador que permite la formación de un complejo entre Bcl-2 y la caspasa 3. Este complejo inhibe la actividad de la caspasa 3 y la subsecuente inhibición de la apoptosis (Malcles *et al.*, 2007).

Utilizando un RNAi dirigido contra la survivina-DeltaEx3, mostró un retardo en la liberación de Smac/DIABLO en la muerte inducida por etopósido, sugiriendo que la apoptosis inducida por este fármaco puede ser regulada por la unión directa de Smac/DIABLO y esta isoforma (Ceballos *et al.*, 2007).

Esferoides

Los esferoides tumorales multicelulares (MTS, del inglés: Multicellular Tumor Spheroids) o cultivos tridimensionales, son cultivos con una complejidad intermedia entre los cultivos en monocapa y los tumores sólidos (Kunz-Schughart *et al.*, 1998). Los cultivos tridimensionales ofrecen un importante potencial para mejorar el estudio de las relaciones fisiológicas de las células y para avanzar en los modelos de sistemas biológicos de células a organismos. Este modelo de cultivo podrá aumentar la predicción en la eficacia de fármacos, así como su toxicidad (Pampaloni *et al.*, 2007) Los MTS presentan una compleja red organizada con contactos e interacciones tridimensionales célula-célula y célula-matriz extracelular, por lo tanto cada célula individual está expuesta a diferentes condiciones de espacio y de disponibilidad de nutrimentos (Mueller-Klieser, 1997 y 2000; Kunz-Schughart *et al.*, 1998 y 1999; Santini y Rainaldi, 2000).

Estructuralmente se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares en los MTS: un centro apoptótico/necrótico, una capa intermedia de células quiescentes y una capa externa de células en proliferación. El centro necrótico/apoptótico aparece en los MTS de más de 500 μ m de diámetro (Kunz-Schughart *et al.*, 1998) (Fig. 4). La formación de estas capas genera microambientes con diferente suministro de oxígeno, nutrimentos, concentración de glucosa, lactato, ATP, factores de crecimiento derivados del suero, concentración de productos de deshecho y pH (Walenta, *et al.*, 2002; Thielecke, *et al.*, 2001). Las dos capas internas del esferoide constituyen un microambiente hostil en el cual existe menor cantidad de nutrientes y de oxígeno (zonas hipóxicas) (Minchinton *et al.*, 2006).

Dentro del esferoide, al incrementarse el número de células y compartamentalizarse, se incrementa también su resistencia a la presencia de diversos fármacos y terapias, tal y como sucede en los tumores *in vivo*, este mecanismo es conocido como resistencia multicelular (Durand y Sutherland 1972).

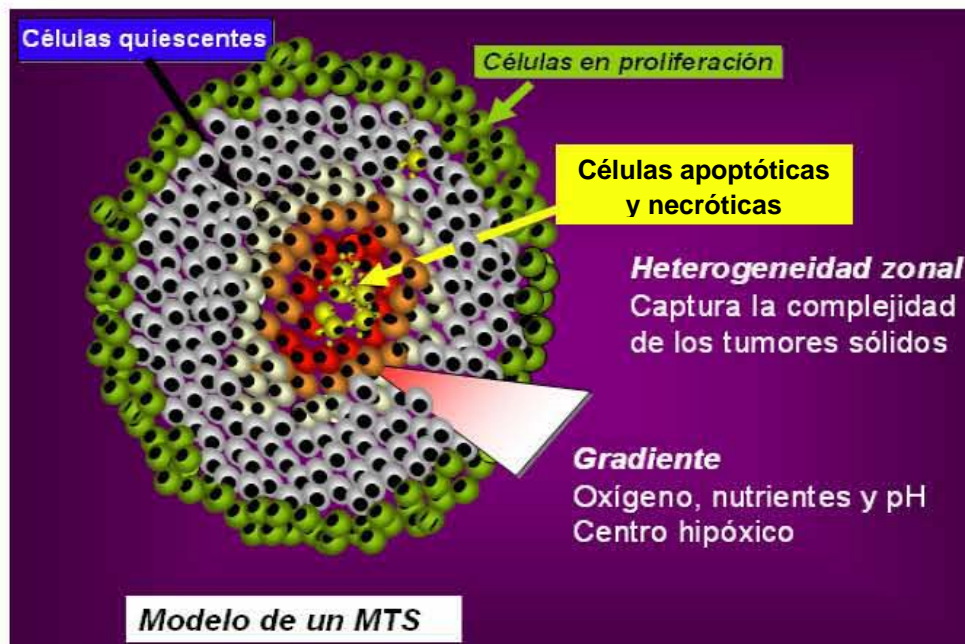


Figura 4. Estructura de un MTS clonogénico que representa sus tres principales capas: células proliferativas, quiescentes y necróticas (Gallardo *et al.*, 2007).

La resistencia multicelular se divide en dos tipos: resistencia adquirida y resistencia intrínseca o inherente a la estructura (Desoize y Jardillier 2000). La resistencia adquirida es generada por diversos factores relacionados con la hipoxia y con el crecimiento tridimensional (Wartenberg *et al.*, 2003, Oloumi, *et al.*, 2002). La resistencia intrínseca es la resistencia que presenta el tumor desde su origen (Giulio *et al.*, 2005).

El manejo de los MTS permite una mejor comprensión de las complicadas relaciones célula-célula y favorece el análisis de diversas enfermedades donde estos contactos están implicados como mecanismo fundamental. El uso de los MTS ha

permitido mejorar el conocimiento de los mecanismos durante el desarrollo tumoral y evaluar con mayor precisión nuevas estrategias para combatir al cáncer.

RNAi

En la década pasada se descubrió un mecanismo natural para silenciar genes denominado RNA de interferencia (RNAi). Este mecanismo se ha conservado durante la evolución y está presente en diversos organismos como: levaduras (Hannon *et al.*, 2002), hongos (Romano *et al.*, 1992), plantas (Naponi *et al.*, 1990), insectos (Pham *et al.*, 2004), nemátodos (Guo *et al.*, 1996; Fire *et al.*, 1998) y mamíferos (Hannon *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2003). El mecanismo por el cual actúa el RNAi es altamente específico y se basa en la degradación del RNA mensajero a partir de la instrucción de un RNA de doble cadena (Hannon *et al.*, 2002; Downward, 2007).

El mecanismo por el que se lleva a cabo el silenciamiento por RNAi puede ser dividido en dos pasos. Durante el primer paso se procesan los RNA de doble cadena (dsRNA), en la ribonucleasa tipo 3 llamada Dicer, que produce RNA interferentes pequeños (siRNA) de 21-25 nucleótidos. Estos siRNA actúan como secuencias guía para la secuencia blanco del RNAm que degradará. En el segundo paso los siRNA se unen a un complejo silenciador inducido por RNA (RISC), el cual tiene un dominio con actividad de helicasa que separa las dos cadenas del siRNA, posteriormente se libera una de las cadenas que se une a secuencia blanco del RNAm y finalmente una proteína con actividad de nucleasa se encarga de degradar el mRNA (Pham *et al.*, 2004) (Fig. 5).

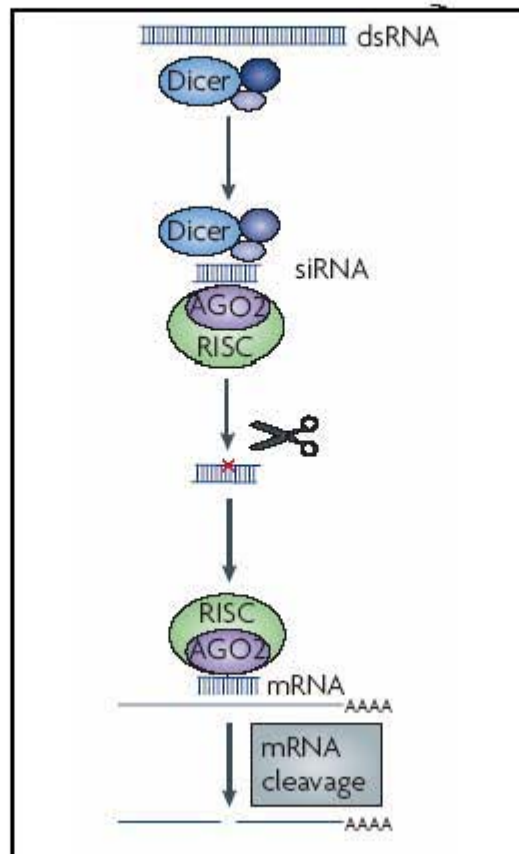


Figura 5. Mecanismo de acción del RNA de interferencia. El RNA de doble hebra (dsRNA) se une a la nucleasa Dicer que corta el dsRNA en fragmentos pequeños de 21-25 nucleótidos (siRNA). Estos últimos inician el ensamblaje del complejo RISC, el cual media la degradación de una de las cadenas, permite que la otra se una al RNA mensajero (mRNA) y sea degradado. (Fougerolles *et al.*, 2007).

Se han usado diferentes estrategias para inducir el silenciamiento por RNAi en modelos *in vivo* (ratón, cerdo y primates), entre las estrategias se encuentran: conjugación directa de los siRNA con un ligando natural como el colesterol (Soutschek *et al.*, 2004), inyección directa de los siRNA desnudo en enfermedades del sistema nervioso central y respiratorio (Reich *et al.*, 2003) y liposomas que encapsulan a siRNA que han sido empleados para el silenciamiento de múltiples blancos (Zimmermann *et al.*, 2006; Morrissey *et al.*, 2006; y Geisbert *et al.*, 2006).

Los RNAi han permitido avances importantes en la biología molecular. Mediante los estudios que se han realizado en los laboratorios y por la eficiencia que

tienen los RNAi pueden ser usados como una poderosa herramienta terapéutica para el tratamiento en algunas enfermedades que estén relacionadas con la elevada expresión de un gen ya identificado; además podría ser ideal para combatir enfermedades virales, el cáncer y enfermedades inflamatorias (Downward, 2007).

HIPÓTESIS

La inhibición de la survivina-DeltaEx3 modifica la cinética de crecimiento de células de cáncer.

OBJETIVOS

General

Determinar el papel de la survivina-DeltaEx3 en la cinética de crecimiento de células de cáncer.

Específicos

1. Establecer el cultivo de células de cáncer en monocapa y en MTS.
 - a. Cultivar células de la línea celular HEK293 en monocapa.
 - b. Cultivar células de la línea celular HEK293 en MTS con la técnica de "liquid-overlay".
2. Determinar cuáles isoformas de la survivina se presentan en líneas de cáncer cultivadas en monocapa y en esferoide.

Determinar por RT-PCR los niveles de expresión de las isoformas de la survivina en cultivo de monocapa y en cultivo de esferoide.
3. Determinar si la inhibición específica de la survivina-DeltaEx3 modifica la cinética de crecimiento.
 - a. Transfectar células HEK293 con el RNAi de la survivina-DeltaEx3.
 - b. Cultivar células transfectadas en monocapa y en esferoide.
 - c. Determinar la capacidad de crecimiento de los esferoides con el RNAi/SurDeltaEx3.
 - d. Determinar la capacidad de clonogenicidad de las células transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3.

METODOLOGÍA

Líneas celulares

HEK293. Línea celular derivada de riñón embrionario de humano. Esta línea contiene adenovirus tipo 5.

Cultivo de monocapa

La línea celular se cultivó en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v).

Cultivo de esferoides

Se utilizó la técnica de "Liquid overlay". Se sembraron 500, 000 células en cajas de Petri de 60 mm previamente cubiertas con una capa de agarosa al 2X, y se cultivaron con medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (v/v). Las células se mantuvieron en la incubadora por 3 días aproximadamente. Posteriormente las células se pasaron a cajas Petri con medio de cultivo Leibovitz L-15 suplementado con suero al 5%. Se mantuvieron por una semana en una incubadora con agitación constante a 100 rpm y con una temperatura de 37°C. Los esferoides se midieron con un micrómetro cada dos días. Se realizó cambio de medio todos los días.

Criopreservación. Se preparó una suspensión de 2×10^6 células/ml/criovial en medio DMEM complementado con DMSO (10%), se congelaron gradualmente y se conservaron a -70°C.

Transfección

La transfección se realizó con liposomas (Lipofectamine 2000). Un día antes de la transfección, las células se sembraron a una concentración de 2×10^5 por caja de 35 mm. Las células se transfectaron con el vector control (pQCXIP/Control) y con el RNAi dirigido contra la Survivina DeltaEx3 (pQCXIP/RNAi/SurDEx3). Para ambas transfecciones se utilizó 1µg de DNA. Las

células transfectadas se incubaron a 37°C por 6 horas. Finalmente se seleccionaron con puromicina durante dos semanas.

Ensayo de clonogenicidad

Las células transfectadas con los vectores pQCXIP/Control y pQCXIP/RNAiSurDeltaEx3, se tripsinizaron. Se realizó un recuento y las células en suspensión se sembraron en una placa de 96 pozos. En la primera dilución se sembraron 5000 células por pozo y se siguieron haciendo diluciones 1:1. Las células se incubaron entre 10 y 15 días a 37°C. Pasado este tiempo, las colonias se lavaron con PBS 1X y se fijaron con etanol al 70% por 10 min a -20°C. Posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 1% en etanol (p/v). 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

El RNA total de las células se extrajo con la técnica de trizol. Brevemente, las células en monocapa o los esferoides se homogenizaron con trizol, se agregó cloroformo, se centrifugaron y la fase acuosa se precipitó con isopropanol. La pureza se comprobó con la relación 260/280 D.O. y la integridad con electroforesis en geles de agarosa.

RT-PCR

La síntesis se hizo a partir de 5 µg de RNA total usando hexámeros al azar, y la enzima transcriptasa reversa termoestable de la siguiente manera: el RNA total se desnaturalizó a 65°C durante 5 minutos, se agregaron hexámeros sintetizados al azar, deoxinucleótidos y la enzima transcriptasa reversa en el buffer adecuado. La reacción se incubó: 25°C 10 min, 50°C 50 min, 85°C 5 min y 37°C 20 min con RNAsa H.

El DNA complementario (DNAC) se amplificó con deoxinucleotidos (dNTPs), buffer, enzima polimerasa DNA termoestable y primers específicos para el gen de interés.

Las condiciones para este ensayo fueron: 2.5 unidades de polimerasa Amplitaq, 2 mM de deoxinucleotidos, 10 picomolar de primers y 1.5 mM de MgCl₂.

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

GAPDH

Sentido 5' CCCCTTCATTGACCTCAACT 3',

Antisentido 5' TTGTCATGGATGACCTTGGC 3'

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

Survivina tipo

Sentido 5' GCCATGAATTCATGGGTGCCCGACGTTGC 3'

Antisentido 5' AGCTCTCTAGAGAGGCCTCAATCCATGGCA 3'.

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

Survivina 2B

Sentido 5' CGAGCGGGCGGATCACGAGAG 3'

Antisentido 5' GCTCGATGGCAAGGAGCACTTT 3'

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

Survivina 3B

Sentido 5' AGGGAGGGACTGGAAGCAAAGAAT 3'

Antisentido 5' ATTGTTGGTTTCATTTGCCTTTCTC 3'

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

Survivina DeltaEx3

Sentido 5' ACGACCCCATGCAAAGGAAACCAACA 3'

Antisentido 5' AGCCCGGAATCAAAACAGCAAAAA 3'

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

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

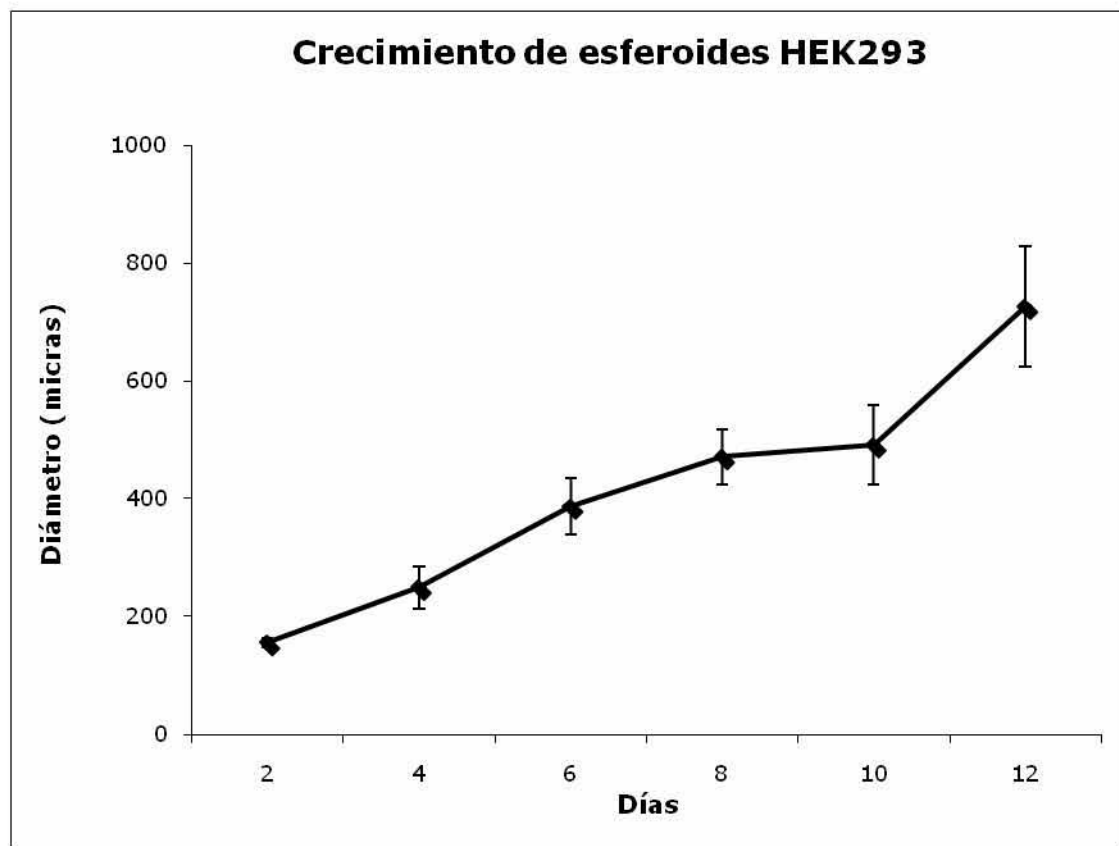
Análisis estadístico.

En el experimento de clonogenicidad, la p se calculó utilizando la prueba de T de Student. Se utilizó el programa estadístico Systat.

RESULTADOS

Cultivo de esferoides

Se estableció el cultivo de esferoides con la línea celular HEK293, utilizando la técnica de "Liquid overlay". Se obtuvieron esferoides cada dos días y se midieron diez esferoides representativos para obtener el promedio. En la gráfica 1 se puede observar que los esferoides en el día 12 llegan a un crecimiento máximo de 750 μ m.



Gráfica 1. Crecimiento de los esferoides en células HEK293. Se utilizó una reglilla graduada para medir los esferoides en un curso temporal de dos a doce días.

En la siguiente figura se muestran fotografías de algunos de los esferoides.

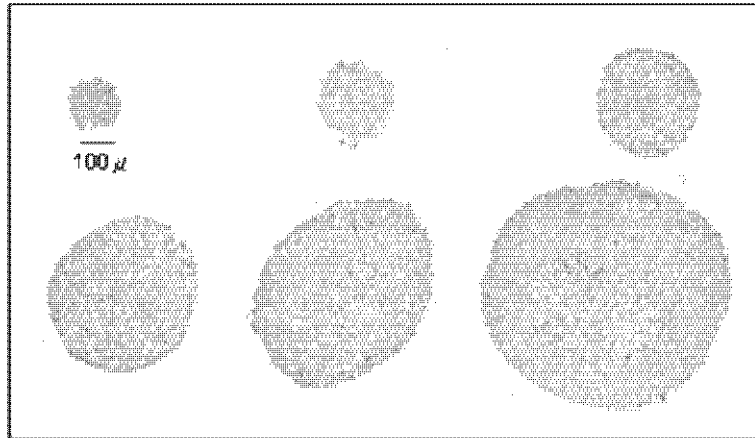


Figura 6. Esferoides de células HEK293. La barra representa 100 micras.

Se observa el crecimiento de los esferoides conforme transcurre el curso temporal, las células del esferoide se ven más compactas que en los primeros días y la estructura en general conforme avanza el tiempo es más redonda.

Expresión de las isoformas de la survivina en la línea celular HEK293 en monocapa y en esferoide.

Se ha reportado la sobreexpresión de la survivina tipo y la expresión de sus isoformas en líneas de cáncer (Altieri *et al.*, 2003; Mahotka *et al.*, 2002). En este proyecto, analizamos la expresión de las isoformas en la línea celular HEK293 cultivada en monocapa y en esferoide.

En la figura 7 se observa la expresión de las isoformas de la survivina en monocapa y en esferoide. La expresión de la survivina tipo tuvo un ligero incremento al cultivar las células en esferoide. La expresión de la survivina-2B se incrementa conforme avanza el tamaño del esferoide. La expresión del RNAm de la survivina-3B, en general se ve aumentada en el esferoide. En contraste, la expresión de la survivina-DelatEx3 disminuye en el cultivo de esferoide y aunque los niveles de expresión del RNAm de esta isoforma aumentan durante el crecimiento del esferoide, en general su expresión es baja, mostrando el nivel más bajo de expresión en la etapa final de crecimiento del esferoide. Posiblemente los niveles de expresión se modifican por los diferentes microambientes que existen en el interior del esferoide, como el gradiente de nutrientes, oxígeno y pH hacia el interior del esferoide. Conforme crece el esferoide aumenta el gradiente y es posible que aumente el número de células que estén en apoptosis, por que la expresión de la survivina y sus isoformas podría estar relacionada con este fenómeno.

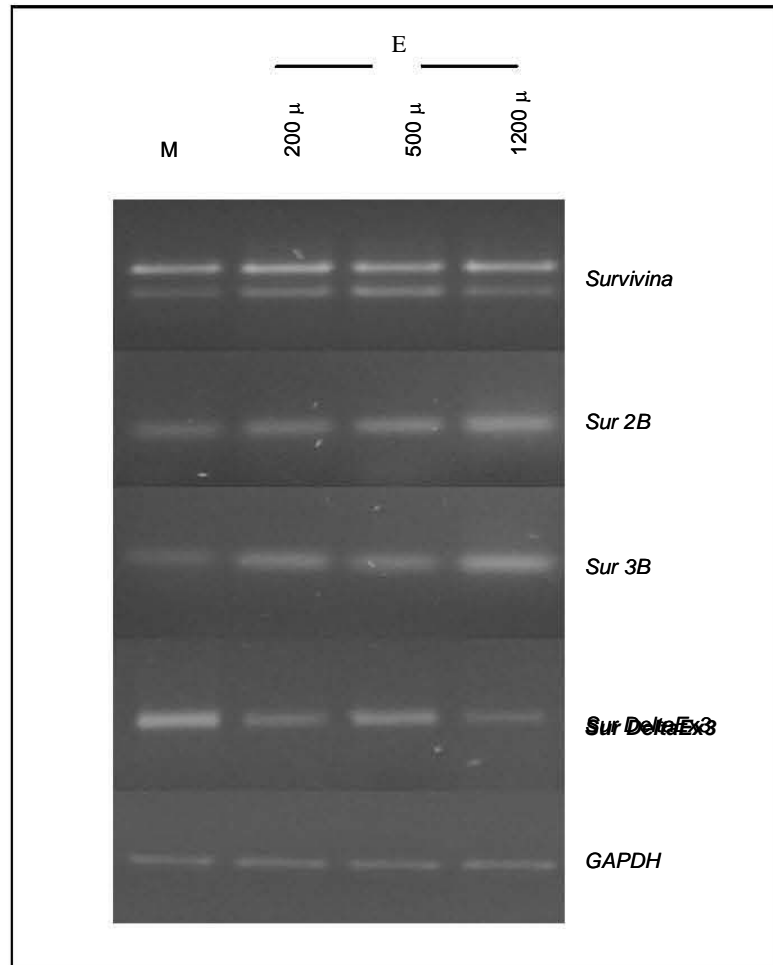


Figura 7. RT-PCR de las isoformas de la survivina. Expresión del RNAm en la línea HEK293 en cultivos en monocapa (M) y en esferoides (E) del diámetro indicado.

Inhibición de la survivina-DeltaEx3 en células HEK293.

La sobreexpresión de la survivina DeltaEx3 en células de cáncer se ha relacionado con la progresión de tumor, estadios más avanzados y con el mal pronóstico en algunos tipos de cáncer (Mahotka, *et al.*, 2002).

Los RNAis que se han diseñado para la survivina inhiben a todas sus isoformas, en este trabajo se utilizó un RNAi específico para la survivina DeltaEx3. Esto es importante ya que nos permite conocer y entender el papel de la survivina-DeltaEx3.

Se verificó la especificidad del RNAi dirigido contra la survivina-DeltaEx3. En la figura 3 se puede observar la inhibición del RNAm de la survivina-DeltaEx3 en las células transfectadas con el pQCXIP/RNAi/Survivina DeltaEx3 al ser comparadas con las células transfectadas con el vector vacío pQCXIP/Control.

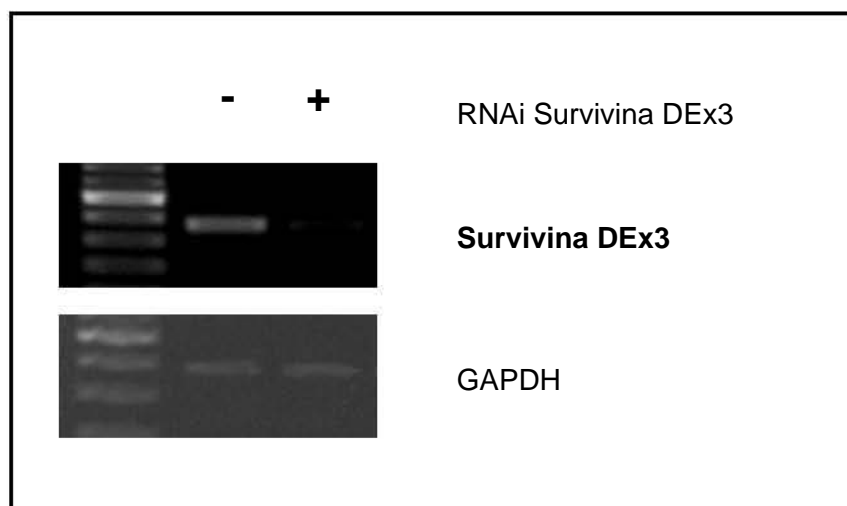


Figura 8. RT-PCR. Inhibición de la survivina-DeltaEx3. Células control (-) y células transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3.

Capacidad de crecimiento de las células de esferoides transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3.

Las células transfectadas con los vectores pQCXIP/Control y pQCXIP/RNAi/SurDEx3, se cultivaron en esferoides con la técnica de "Liquid overlay" para determinar su capacidad de crecimiento.

El tamaño de los esferoides pQCXIP/Control y los esferoides pQCXIP/RNAi/SurDEx3 se determinó a los 6 días.

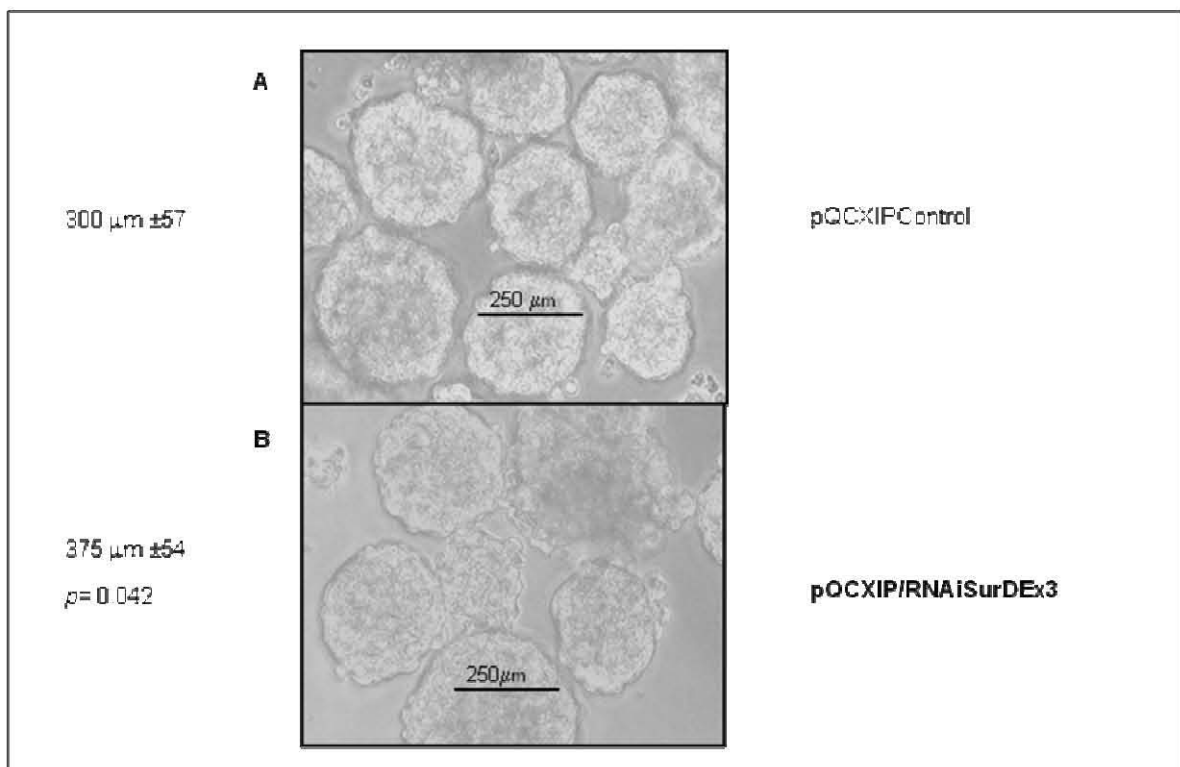


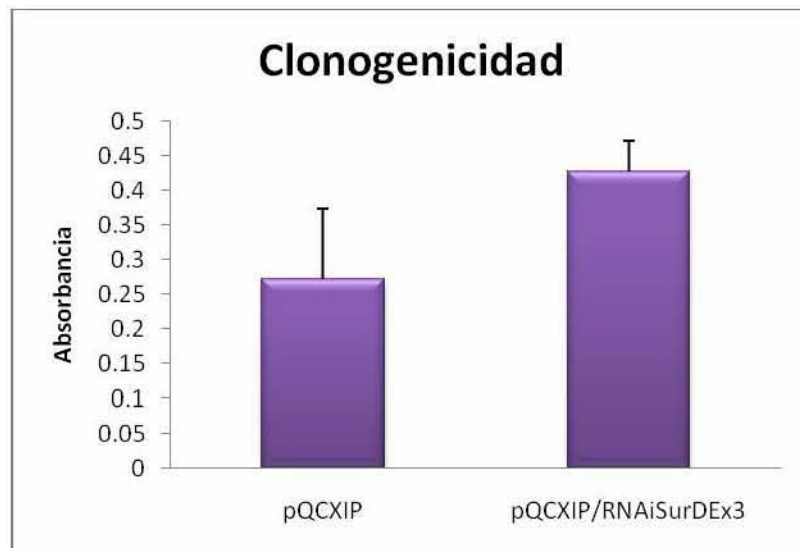
Figura 9. Esferoides de células HEK293 transfectadas con el RNAi de la survivina DeltaEx3. A) Esferoides de células HEK293 transfectadas con el vector vacío pQCXIP/Control, B) Las células HEK293 transfectada con el vector pQCXIP/RNAi/SurDEx. La barra corresponde a 250 micras. Se hicieron 3 experimentos. La $p= 0.042$.

Como se puede observar en la Fig. 9, los esferoides pQCXIP/Control miden 300μm ±57 y los esferoides pQCXIP/RNAi/SurDEx3 miden 375μm ±54. Los esferoides pQCXIP/RNAi/SurDEx3 crecen más y su crecimiento es significativo ($p= 0.042$).

Capacidad de clonogenicidad de las células transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3.

La técnica de clonogenicidad nos permite cuantificar las células que tienen capacidad de formar clonas. Se ha asociado la pérdida de la clonogenicidad con la disminución de la survivina tipo y de XIAP (Iizuka D. *et al.*, 2007), pero no hay estudios en los que se reporte la clonogenicidad de las isoformas de la survivina.

Se determinó la clonogenicidad de las células transfectadas con el pQCXIP/Control y con el pQCXIP/RNAi/SurDEx. Como se muestra en la gráfica 2, la capacidad de clonogenicidad de las células transfectadas con pQCXIP/RNAi/SurDeltaEx3 es mayor que la de las células transfectadas con el pQCXIP/Control.



Gráfica 2. Ensayo de clonogenicidad de las células transfectadas con el pQCXIP/Control y con el pQCXIP/RNAi/SurDeltaEx3.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

La disminución en la apoptosis es una de las principales causas de cáncer. Una de las principales familias que inhiben la apoptosis, son las Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs), las cuales están altamente conservadas durante la evolución. En 1997, se identificó a la proteína survivina, perteneciente a esta familia.

La survivina es expresada durante el desarrollo y en las células proliferativas, pero es indetectable en la mayoría del tejido diferenciado (Altieri *et al.*, 2006). Esta proteína se encuentra sobreexpresada en los tumores sólidos y líquidos más comunes, incluyendo cáncer de pulmón (Monzo *et al.*, 1999), mama (Tanaka *et al.*, 2000), colón (Kawasaki *et al.*, 1998), estómago (Lu *et al.*, 1998), cérvico-uterino (Saiton *et al.*, 1999), linfoma de no-Hodgkin (Ambrosini *et al.*, 1997) y leucemias (Adida *et al.*, 2000). En los cuales promueve la progresión del ciclo celular. Su expresión está relacionada con la resistencia a terapias contra el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia (Adida *et al.*, 1998 y 2000; Islam *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 1998; Monzo *et al.*, 1999; Sarela *et al.*, 2001; Swana *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000).

Algunos experimentos han demostrado que la disminución de la expresión de la survivina en células de cáncer, causa interrupción en el ciclo celular, induce apoptosis (Chen *et al.*, 2000; Olie *et al.*, 2000) y aumenta la sensibilidad de las células a los antineoplásicos (Yan *et al.*, 2006; Caldas *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2002; Grossman, *et al.*, 2001; Mesri *et al.*, 2001; Olie *et al.*, 2000).

Se han identificado diferentes isoformas de la survivina resultado del splicing alternativo: la survivina tipo, que ha sido la más estudiada, la survivina-2B, la survivina-DeltaEx3 (Mahotka *et al.*, 1999), la survivina-3B (Badran *et al.*, 2004) y la survivina-2 α (Caldas *et al.*, 2005 b). Además de sus diferencias estructurales las isoformas de la survivina tienen diferentes

potenciales apoptóticos y su expresión varía en los diferentes estadios y tipos de cáncer.

A la survivina-DeltaEx3 se le ha asociado con los estadios más avanzados en cáncer renal (Mahotka *et al.*, 2002), en cáncer cervicouterino (Espinosa *et al.*, 2006) y en tumores de meduloblastoma (Li *et al.*, 2007); y en algunos casos se le asoció con los cánceres más agresivos y con la recurrencia.

La regulación de las isoformas de la survivina en el cáncer, aún se desconoce. La survivina-DeltaEx3 se ha correlacionado con estadios avanzados de este tipo de enfermedad y aunque es diferente estructuralmente a la survivina tipo, conserva su potencial antiapoptótico.

En este proyecto se decidió analizar el papel de la survivina-DeltaEx3 en la cinética de crecimiento de las células HEK293. Para un estudio más aproximado a las condiciones *in vivo* del funcionamiento de las moléculas que participan en el proceso tumorigénico, en este caso de la survivina-DeltaEx3, se empleó un modelo tridimensional.

Este es el primer reporte de la expresión de las isoformas de la survivina en este tipo de cultivo. La expresión del RNAm de las diferentes isoformas, se analizó por RT-PCR en un curso temporal de esferoides. Se pudo observar una expresión diferencial de las isoformas, con la mayor expresión de la survivina-DeltaEx3. Probablemente esta expresión esté asociada con el potencial antiapoptótico de cada una de las isoformas, así como del papel que tiene cada una de ellas durante el ciclo celular. Con respecto a la expresión en el curso temporal de esferoides, se observó que la survivina-DeltaEx3 modificó su expresión durante el crecimiento del esferoide, mostrando una mayor expresión en la etapa intermedia del esferoide. Considerando que en el modelo de esferoides las células están sometidas a diferentes condiciones y están en diferente fase del ciclo celular la expresión de las isoformas podría estar relacionada a estos dos factores, en el caso de la survivina-DeltaEx3 se sabe que no participa durante el ciclo celular, pero es posible que su ausencia

altere la expresión de la survivina tipo durante el ciclo celular y también puede modificar su papel durante la apoptosis (Fig. 7).

Hasta la fecha, los RNAsi diseñados para inhibir a la survivina, inhiben a varias o a todas las isoformas y no nos permiten determinar la función específica. Las funciones de cada una de las isoformas pueden asemejarse o ser distintas en cada proceso o respuesta celular, por lo que, para dilucidar el papel que desempeña una isoforma específicamente, es necesario el uso de un RNAi dirigido para cada una.

En este proyecto se utilizó un RNA de interferencia diseñado específicamente para inhibir a la survivina-DeltaEx3. Este RNAi está dirigido a una secuencia entre el exón 2 y el exón 4, el cual fue diseñado en el laboratorio. La inhibición del RNAi/SurDeltaEx3 se verificó por medio de RT-PCR, mostrando una inhibición de aproximadamente el 100% (Fig. 8).

Para conocer de qué forma la inhibición de la survivina-DeltaEx3 afecta el crecimiento de los esferoides, se determinó el tamaño de los esferoides de las células transfectadas con pQCXIP/Control y con pQCXIP/RNAi/SurDEx3. La capacidad de crecimiento de los esferoides con el pQCXIP/RNAi/Survivina DeltaEx3, se incrementó significativamente ($p=0.042$) con respecto a los esferoides pQCXIP/Control. Ver la figura 9. Análisis *in vitro* han mostrado que la survivina-2B y la survivina-Deltax3 puede interactuar con la survivina tipo para formar heterodímeros (Noton *et al.*, 2006). Posiblemente la inhibición de la survivina-DeltaEx3 cause una desregulación en la formación de los heterodímeros o esté actuando como una antagonista de la survivina tipo.

Por último se determinó la capacidad de clonogenicidad de las células inhibiendo a la survivina-DeltaEx3. Este experimento es importante porque determina la capacidad de una célula de formar colonias en ausencia de factores extracelulares. Se observó que las células con el pQCXIP/RNAi/SurDeltaEx3 tienen mayor capacidad de formación de colonias que la de las células transfectadas con el pQCXIP/Control (gráfica 2). Noton

menciona que cuando la survivina-DeltaEx3, se sobreexpresa, no influye en la proliferación y que la presencia de esta proteína no es necesaria para progresión del ciclo celular. Es probable que al inhibir a una isoforma se altere el balance y se incrementó la proliferación celular, por la liberación de la survivina tipo o por el aumento de las otras isoformas.

El presente trabajo mostró el papel de la survivina-DeltaEx3 en la cinética de crecimiento de células de cáncer. Se estableció el cultivo de células de cáncer en monocapa y en esferoide. Se determinaron las isoformas de la survivina que se presentan en líneas de cáncer en monocapa y en esferoide. Se determinó que la inhibición específica de la survivina-DeltaEx3 modifica el crecimiento en los esferoides. Y se determinó la capacidad de clonogenicidad de las células transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3.

La interacción entre las isoformas de la survivina, la regulación que se da entre ellas y su diferente localización celular, son factores que dificultan conocer y comprender mejor el papel específico de cada una de ellas, tanto en el proceso apoptótico como en la proliferación. Por lo que es importante la utilización de RNAs específicos para cada isoforma. De esta manera se podría dilucidar como es la regulación entre las isoformas de la survivina en el ciclo celular y el mecanismo por el cual las isoformas inhiben la apoptosis.

Perspectivas. Se sobreexpresará a la survivina-DeltaEx3, para conocer los efectos que tendría tanto en el crecimiento, como en la capacidad de clonogenicidad de las células. Posteriormente se realizará un análisis de la localización de esta proteína dentro del esferoide. De esta manera se podrá asociar a la survivina-DeltaEx3 con una población en especial, dilucidando mejor el papel que podría desempeñar en la progresión del tumor.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

La disminución en la apoptosis es una de las principales causas de cáncer. Una de las principales familias que inhiben la apoptosis, son las Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs), las cuales están altamente conservadas durante la evolución. En 1997, se identificó a la proteína survivina, perteneciente a esta familia.

La survivina es expresada durante el desarrollo y en las células proliferativas, pero es indetectable en la mayoría del tejido diferenciado (Altieri *et al.*, 2006). Esta proteína se encuentra sobreexpresada en los tumores sólidos y líquidos más comunes, incluyendo cáncer de pulmón (Monzo *et al.*, 1999), mama (Tanaka *et al.*, 2000), colón (Kawasaki *et al.*, 1998), estómago (Lu *et al.*, 1998), cérvico-uterino (Saiton *et al.*, 1999), linfoma de no-Hodgkin (Ambrosini *et al.*, 1997) y leucemias (Adida *et al.*, 2000). En los cuales promueve la progresión del ciclo celular. Su expresión está relacionada con la resistencia a terapias contra el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia (Adida *et al.*, 1998 y 2000; Islam *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 1998; Monzo *et al.*, 1999; Sarela *et al.*, 2001; Swana *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000).

Algunos experimentos han demostrado que la disminución de la expresión de la survivina en células de cáncer, causa interrupción en el ciclo celular, induce apoptosis (Chen *et al.*, 2000; Olie *et al.*, 2000) y aumenta la sensibilidad de las células a los antineoplásicos (Yan *et al.*, 2006; Caldas *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2002; Grossman, *et al.*, 2001; Mesri *et al.*, 2001; Olie *et al.*, 2000).

Se han identificado diferentes isoformas de la survivina resultado del splicing alternativo: la survivina tipo, que ha sido la más estudiada, la survivina-2B, la survivina-DeltaEx3 (Mahotka *et al.*, 1999), la survivina-3B (Badran *et al.*, 2004) y la survivina-2 α (Caldas *et al.*, 2005 b). Además de sus diferencias estructurales las isoformas de la survivina tienen diferentes

potenciales apoptóticos y su expresión varía en los diferentes estadios y tipos de cáncer.

A la survivina-DeltaEx3 se le ha asociado con los estadios más avanzados en cáncer renal (Mahotka *et al.*, 2002), en cáncer cervicouterino (Espinosa *et al.*, 2006) y en tumores de meduloblastoma (Li *et al.*, 2007); y en algunos casos se le asoció con los cánceres más agresivos y con la recurrencia.

La regulación de las isoformas de la survivina en el cáncer, aún se desconoce. La survivina-DeltaEx3 se ha correlacionado con estadios avanzados de este tipo de enfermedad y aunque es diferente estructuralmente a la survivina tipo, conserva su potencial antiapoptótico.

En este proyecto se decidió analizar el papel de la survivina-DeltaEx3 en la cinética de crecimiento de las células HEK293. Para un estudio más aproximado a las condiciones *in vivo* del funcionamiento de las moléculas que participan en el proceso tumorigénico, en este caso de la survivina-DeltaEx3, se empleó un modelo tridimensional.

Este es el primer reporte de la expresión de las isoformas de la survivina en este tipo de cultivo. La expresión del RNAm de las diferentes isoformas, se analizó por RT-PCR en un curso temporal de esferoides. Se pudo observar una expresión diferencial de las isoformas, con la mayor expresión de la survivina-DeltaEx3. Probablemente esta expresión esté asociada con el potencial antiapoptótico de cada una de las isoformas, así como del papel que tiene cada una de ella durante el ciclo celular. Con respecto a la expresión en el curso temporal de esferoides, se observó que la survivina-DeltaEx3 modificó su expresión durante el crecimiento del esferoide, mostrando una mayor expresión en la etapa intermedia del esferoide. Considerando que en el modelo de esferoides las células están sometidas a diferentes condiciones y están en diferente fase del ciclo celular la expresión de la isoformas podría estar relacionada a estos dos factores, en el caso de la survivina-DelatEx3 se sabe que no participa durante el ciclo celular, pero es posible que su ausencia

altere la expresión de la survivina tipo durante el ciclo celular y también puede modificar su papel durante la apoptosis (Fig. 7).

Hasta la fecha, los RNAsi diseñados para inhibir a la survivina, inhiben a varias o a todas las isoformas y no nos permiten determinar la función específica. Las funciones de cada una de las isoformas pueden asemejarse o ser distintas en cada proceso o respuesta celular, por lo que, para dilucidar el papel que desempeña una isoforma específicamente, es necesario el uso de un RNAi dirigido para cada una.

En este proyecto se utilizó un RNA de interferencia diseñado específicamente para inhibir a la survivina-DeltaEx3. Este RNAi está dirigido a una secuencia entre el exón 2 y el exón 4, el cual fue diseñado en el laboratorio. La inhibición del RNAi/SurDeltaEx3 se verificó por medio de RT-PCR, mostrando una inhibición de aproximadamente el 100% (Fig. 8).

Para conocer de qué forma la inhibición de la survivina-DeltaEx3 afecta el crecimiento de los esferoides, se determinó el tamaño de los esferoides de las células transfectadas con pQCXIP/Control y con pQCXIP/RNAi/SurDEx3. La capacidad de crecimiento de los esferoides con el pQCXIP/RNAi/Survivina DeltaEx3, se incrementó significativamente ($p=0.042$) con respecto a los esferoides pQCXIP/Control. Ver la figura 9. Análisis *in vitro* han mostrado que la survivina-2B y la survivina-Deltax3 puede interactuar con la survivina tipo para formar heterodímeros (Noton *et al.*, 2006). Posiblemente la inhibición de la survivina-DeltaEx3 cause una desregulación en la formación de los heterodímeros o esté actuando como una antagonista de la survivina tipo.

Por último se determinó la capacidad de clonogenicidad de las células inhibiendo a la survivina-DeltaEx3. Este experimento es importante porque determina la capacidad de una célula de formar colonias en ausencia de factores extracelulares. Se observó que las células con el pQCXIP/RNAi/SurDeltaEx3 tienen mayor capacidad de formación de colonias que la de las células transfectadas con el pQCXIP/Control (gráfica 2). Noton

menciona que cuando la survivina-DeltaEx3, se sobreexpresa, no influye en la proliferación y que la presencia de esta proteína no es necesaria para progresión del ciclo celular. Es probable que al inhibir a una isoforma se altere el balance y se incrementó la proliferación celular, por la liberación de la survivina tipo o por el aumento de las otras isoformas.

El presente trabajo mostró el papel de la survivina-DeltaEx3 en la cinética de crecimiento de células de cáncer. Se estableció el cultivo de células de cáncer en monocapa y en esferoide. Se determinaron las isoformas de la survivina que se presentan en líneas de cáncer en monocapa y en esferoide. Se determinó que la inhibición específica de la survivina-DeltaEx3 modifica el crecimiento en los esferoides. Y se determinó la capacidad de clonogenicidad de las células transfectadas con el RNAi de la survivina-DeltaEx3.

La interacción entre las isoformas de la survivina, la regulación que se da entre ellas y su diferente localización celular, son factores que dificultan conocer y comprender mejor el papel específico de cada una de ellas, tanto en el proceso apoptótico como en la proliferación. Por lo que es importante la utilización de RNAs específicos para cada isoforma. De esta manera se podría dilucidar como es la regulación entre las isoformas de la survivina en el ciclo celular y el mecanismo por el cual las isoformas inhiben la apoptosis.

Perspectivas. Se sobreexpresará a la survivina-DeltaEx3, para conocer los efectos que tendría tanto en el crecimiento, como en la capacidad de clonogenicidad de las células. Posteriormente se realizará un análisis de la localización de esta proteína dentro del esferoide. De esta manera se podrá asociar a la survivina-DeltaEx3 con una población en especial, dilucidando mejor el papel que podría desempeñar en la progresión del tumor.

ANEXOS

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos
BIR	Dominio de Repeticiones de IAPs Baculovirales
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
Cdcs	Cinasas dependientes de ciclinas
CPC	Complejo Pasajero Cromosomal
DISC	Complejo de Señalización de Inducción de Muerte
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidad óptica
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
IAPs	Proteínas Inhibidoras de Apoptosis
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RING	Anillo de dedo de zinc
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN
RNA	Ácido ribonucleic
RNAi	ARN de interferencia
RNA _m	ARN mensajero

ABREVIATURAS DE MEDIDA

ml	Mililitros
μ l	Microlitros
mM	Milimoles
hrs	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
pb	Pares de bases
μ m	micras

REFERENCIAS

Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-6.

Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. 1998. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 351:882-83.

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. 2000. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 96:1921-25

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

Agrawal N. 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Molecular Biology Review* 67(4): 657-685.

Altieri DC. 2003. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22: 8581-9.

Ambrosini G, Adida C, Sirugo A, Altieri DC. 1998. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *Journal Biology Chemistry* 273: 1177-82.

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. 2004. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 314(3):902-7.

Caldas H, Fangusaro JR, Boué DR, Holloway MP, Altura RA. 2007. Dissecting the role of endothelial Survivin DeltaEx3 in angiogenesis. *Blood* 109(4):1479-89.

Caldas H, Honsey LE, Altura RA. 2005 (b). Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular Cancer* 4(1):116-125.

Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, Altura RA. 2005 (a). Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 24: 1994-2007.

Carvalho A, Carmena M, Sambade C, ERNshaw WC, Wheatley SP. 2003. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *Journal Cell Science* 116: 2987-98.

Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V y Melendez-Zajgla J. 2007. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene*.

Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowser LM, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, Reed JC. 2000. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. 2000. *Neoplasia* 2: 235-41.

Cryns V, Yuan Y. 1999. Proteases to die for. *Genes Develop* 12: 1551-70.

De Fougerolles A, Vornlocher H, Maraganore J y Lieberman. 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Drug Discovery* 6:443-453.

Deveraux QL, Reed JC. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Gen Develop* 13: 239-52.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. 2004. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *Journal Clin Invest* 114: 1117-27.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. y Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.

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

Fangusaro JR, Caldas H, Jiang Y, Altura RA. 2006. Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer. *Pediatr Blood Cancer* 47(1):4-13.

Fangusaro JR, Jiang Y, Holloway MP, Caldas H, Singh V, Boue DR, Hayes J, Altura RA. 2005. Survivin, Survivin-2B, and Survivin-deltaEx3 expression in medulloblastoma: biologic markers of tumour morphology and clinical outcome. *British Journal Cancer* 92(2):359-65.

Ferrandina G, Legge F, Martinelli E, Ranelletti FO, Zannoni GF, Lauriola L, Gessi M, Gallotta V, Scambia G. 2005 Survivin expression in ovarian cancer and its correlation with clinico-pathological, surgical and apoptosis-related parameters. *British Journal Cancer* 92(2):271-7.

Fire A. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-811.

Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. 2002. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *Journal Cell Science* 115: 575-85.

Fraser A.G. 2000. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408(6810): 325-330.

Gallardo JC, Espinosa M, Meléndez J y Maldonado V. 2006. Esferoides Tumorales Multicelulares en la evaluación de las estrategias terapéuticas anticancerosas. *REB* 25(4): 101-107.

Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Saccani G, Frati L, Agliano AM. 2003. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncology* 14(1):85-90.

Geisbert TW, Hensley LE, Kagan E, Yu EZ, Geisbert JB, Daddario-DiCaprio K, Fritz EA, Jahrling PB, McClintock K, Phelps JR, Lee AC, Judge A, Jeffs LB, MacLachlan I. 2006. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *Journal Infect Disease* 193(12):1650-7.

Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. 1999. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest* 79:1121-26.

Guo, S. y Kemphues K J. 1996. Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Current Opinion Genetic Development* 6(4): 408-415.

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell Press* 100(1):57-70.

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

Iizuka D, Inanami O, Kashiwakura I, Kuwabara M. 2007. Purvalanol A enhances cell killing by inhibiting up-regulation of CDC2 kinase activity in tumor cells irradiated with high doses of X rays. *Radiat Res.* 167(5):563-71.

Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A. 2000. Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Med Pediatric Oncology* 35(6):550-3.

Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. 2000. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 19:1346-53.

Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. 2000. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* Johnson ME y Howerth EW. 2004. Survivin: A bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathology* 41: 599-607.

Kallio MJ, Nieminen M, Eriksson JE. 2001. Human inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit. *FASEB* 15: 2721-23.

Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y. 2001 Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *International Journal Cancer* 95:92-95.

Kawasaki H, Altieri D, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. 1998. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Research* 58:5071-74.

Knauer SK, Bier C, Schlag P, Fritzmann J, Dietmaier W, Rödel F, Klein-Hitpass L, Kovács AF, Döring C, Hansmann ML, Hofmann WK, Kunkel M, Brochhausen

C, Engels K, Lippert BM, Mann W, Stauber RH. 2007. The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* 6(12):1502-9.

Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. 1998. Multicellular tumour spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *International Journal Exp Path* 79:1-23.

Lee, RC, Feinbaum RL, and Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843-854.

Li F, Altieri DC. 1999. The cancer anti-apoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Reserch* 59: 3143-51.

Lopes R, Castro I, Pontes P, Candeias J, Lemoine NR, Sambade C. 2005. Expression profile of survivin in acute leukaemias: the importance of differential splicing. *Leukemia* 19(7):1284-6.

Lu C, Altieri DC, Tanigawa N. 1998 Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 58:1808-12.

Maeda I. 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by highthroughput RNAi. *Current Biology* 11(3): 171-176.

Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD. 2002. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 9(12):1334-42.

Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. 1999. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor

survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Research* 59(24):6097-102.

Malcles MH, Wang HW, Koumi A, Tsai Y-H, Yu M, Godfrey A y Boshoff C. 2007. Characterisation of the anti-apoptotic function of survivin-DeltaEx3 during TNFalpha-mediated cell death. *British Journal Cancer* 96(11): 1659-66.

Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. 1999. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *Journal Clinical Oncology* 17:2100-04.

Pampoloni F, Reynaud EG y Stelzer E. 2007. The third dimension bridges the gap between cell cultura and live tissue. *Molecular Cell Biology* 8:839-845.

Saitoh Y, Yaginuma Y, Ishikawa M. 1999. Analysis of Bcl-2, Bax and survivin genes in uterine cancer. *International Journal Oncology* 15:137-41.

Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. 2001. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 92:271-78.

Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. 1999. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 341:452-53.

Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. 2000. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clinic Cancer Research* 6:127-34.

Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. 2000. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 113:4363-71.

Li F. 2005. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *British Journal of Cancer* 92(2):212-6.

Marconi A, Dallaglio K, Lotti R, Vaschieri C, Truzzi F, Fantini F, Pincelli C. 2007. Survivin Identifies Keratinocyte Stem Cells and Is Downregulated by Anti- β 1 Integrin During Anoikis. *Stem Cells* 25(1):149-55.

Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. 2004. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer. *Cancer Letter* 216(2):147-55.

Miyawaki-Shimizu K, Predescu D, Shimizu J, Broman M, Predescu S, Malik AB. 2006. siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(2):L405-13.

Mueller-Klieser W. 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal Physiology* 273:C1109-C1123.

Mueller-Klieser W. 2000. Tumour biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 36:123-139.

Napoli C, Lemieux C, y Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2(4): 279-289.

Noton E, Colnaghi R, Tate S, Starck C, Carvalho A, Ferrigno P, Wheatley S. 2006. Molecular analysis of survivin isoforms. *Journal Biology Chemistry* 281: 1286-1295.

O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. 2000. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13103-07.

O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. 2000. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *American Journal Pathology* 156: 393-8.

Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zahgmeister-Wittke U. 2000. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Research* 60: 2805-9.

Ouhtit A, Matrougui K, Bengrine A, Koochekpour S, Zerfaoui M, Yousief Z. 2007. Survivin is not only a death encounter but also a survival protein for invading tumor cells. *Front Biosci* 12:1260-70.

Pham JW. 2004. A Dicer-2-Dependent 80S Complex Cleaves Targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117(1): 83-94.

Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM, Bennett J, Tolentino MJ. 2003. *Molecular Vision* 9:210-6.

Romano N y Macino G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6(22): 3343-53.

Ryan B, O'Donovan N, Browne B, O'Shea C, Crown J, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. 2005. Expression of survivin and its splice variants survivin-2B and survivin-DeltaEx3 in breast cancer. *British Journal Cancer* 92(1):120-4.

Song Z, Yao X, Wu M. 2003. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *Journal Biology Chemistry* 278: 23130-40.

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Röhl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. 2004.

Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas. *Oncology Report* 13(5):891-7.

Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. 1971. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal Natl Cancer Inst* 46:491-495.

Taubert H, Kappler M, Bache M, Bartel F, Köhler T, Lautenschläger C, Blümke K, Würfl P, Schmidt H, Meye A, Hauptmann S. 2005. Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients. *Oncogene* 24(33):5258-61.

Suga K, Yamamoto T, Yamada Y, Miyatake S, Nakagawa T, Tanigawa N. 2005. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432(7014):173-8.

Tijsterman M. y Plasterk RH. 2004. Dicers at RISC, The Mechanism of RNAi. *Cell* 117(1): 1-3.

Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, Choo KH. 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current Biology* 10: 1319-28.

Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He TC, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B, Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Kinzler KW. 1999. Analysis of human transcriptomes, *Nature Gen* 23: 387-8.

Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. 2000. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature Structural Biology* 7: 602-8.

Wyllie H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.

Yang L, Cao Z, Yan H, Wood WC. 2003. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Reserch* 63(20): 6815-24.

Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. 2002. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *British Journal Cancer* 87(1):91-7.

Yuan J. Transducing signals of life and death. 1997. *Current Opinion Cell Biology* 9: 247-51.

Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, Pilotti S, Zunino F, Daidone MG. 2002. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovary cancer. *Cell Molecular Life Science* 59: 1406-12.

Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. 2005. Survivin es a target for new anticancer interventions. *Journal Cell Molecular Medicin* 9: 360-72.

Zheng W, Ma X, Wei D, Wang T, Ma Y, Yang S. 2005. Molecular cloning and bioinformatics analysis of a novel spliced variant of survivin from human breast cancer cells. *DNA Sequence* 16(5):321-8.

Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Röhl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441(7089):111-4.