



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Silenciamiento del gen BIRC3
mediante ARN de interferencia
en un modelo celular de cáncer
cervicouterino**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

PRESENTA:

Paola Berenice Mass Sánchez

Dr. Jorge Meléndez Zajgla
Asesor

M. en C. Maritere
Domínguez Rojas
Co-asesora

Cuautitlán Izcalli, Estado de
México

2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Silenciamiento del gen BIRC3 mediante ARN de Interferencia en un modelo celular de cáncer cervicouterino.

Que presenta la pasante: Paola Berenice Mass Sánchez
Con número de cuenta: 412059979 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Mayo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Rosa María de los Ángeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica, bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla y con el apoyo de la Dra. Magali Espinosa Castilla.

Dedicatoria

*A mis abuelos, quienes siempre creyeron
en mí y me motivaron para continuar
persiguiendo mis sueños.
Siempre han sido un ejemplo de perseverancia,
fortaleza y sobre todo de amor.*

Agradecimientos

Al Dr. Jorge Mélenlez Zajgla por permitirme formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio y sus valiosas aportaciones a la ciencia genómica, así como su apoyo para realizar este trabajo y la atención que tuvo en todo momento.

A la Dra. Magali Espinosa Castilla, quien me apoyó en todo el trabajo experimental que realicé en el laboratorio, por su amabilidad, paciencia, atención y disposición para ayudarme siempre que lo necesité.

A la Dra. Martha Orozco Quiyono, quien me permitió conocer la importancia de la bioética en la práctica profesional y siempre fue un ejemplo de perseverancia, paciencia y amor a su trabajo.

Al cuerpo académico de la FESC, porque a través de los conocimientos que compartieron conmigo contribuyeron a mi formación académica y profesional.

A mis amigos Toño y Josué, que por años han estado a mi lado animándome a afrontar retos y tomar decisiones, su cariño y amistad es invaluable e incondicional, los admiro y respeto por todo lo que me han enseñado.

A mis amigos de la facultad, Larissa, Abraham, Yair y Alejandro, que estuvieron conmigo para aconsejarme y apoyarme siempre que lo necesité y gracias por compartir conmigo experiencias que hicieron la universidad una de las mejores etapas de mi vida. A mis amigos Alan y Rafa con quienes viví experiencias inolvidables y con quienes formé una pequeña familia cuando vivimos juntos que espero conservar muchos años más; gracias a todos por sus consejos, risas y aprecio.

A mi familia, especialmente a mis hermanas, Monse y Eimy a quienes les tengo mucho cariño y admiración y se han convertido en modelos de vida.

A mi mamá, por ser ejemplo de convicción, fortaleza, comprensión y amor, porque a pesar de tener diferencias, siempre encontramos la forma de conciliarnos y siempre me apoya en las decisiones que tomo y se ha convertido en una consejera de vida.

A mi papá, en quien encuentro perseverancia, compromiso, dedicación y amor, que siempre me ha escuchado y apoyado en todas las decisiones, a quien admiro por todo lo que ha logrado y que siempre ha puesto como prioridad a la familia.

Gracias padres por ser el mejor ejemplo de familia, comprensión, apoyo y amor; admiro y agradezco todos los sacrificios que hicieron para que cumpliera las metas que me propongo. Los admiro y amo profundamente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque promueve valores que crearon en mí un espíritu del que me siento orgullosa y me brindó durante la licenciatura un segundo hogar al que le tengo admiración, respeto y cariño, me enseñó, sobre todo, que ***"por mi raza hablará el espíritu"***.

Índice

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
1.	Cáncer	2
1.1.	Epidemiología del cáncer	2
1.2.	Marcadores de cáncer	3
2.	Apoptosis	4
2.1.	Vías apoptóticas	5
2.1.1	Vía extrínseca.....	6
2.1.2	Vía intrínseca.....	7
2.1.3	Fase ejecutora.....	8
3.	Proteínas inhibidoras de la apoptosis.....	8
3.1.	BIRC3	9
4.	ARN de interferencia	12
4.1.	Fisiología de los ARNi	12
5.	Esferoides como modelo celular	13
III.	Antecedentes	15
IV.	Justificación	16
V.	Objetivos.....	17
1.	Objetivo general	17
2.	Objetivos particulares.....	17
VI.	Hipótesis	18
VII.	Metodología	19
1.	Esquema de trabajo.....	19
2.	Cultivo celular	20
3.	Diseño de ARN de interferencia dirigido contra BIRC3	20
4.	Alineación de oligos para el ARN de interferencia	20
5.	Amplificación de plásmido.....	21
6.	Digestiones con enzimas de restricción específicas.....	21
7.	Purificación del vector	21
8.	Ligación	22
9.	Transformación	22

10.	Amplificación de plásmido transformado.....	23
11.	Transfección	23
12.	Extracción de ARN total.....	24
13.	Síntesis de ADN complementario	24
14.	Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativo (PCR).....	25
15.	Extracción de proteínas.....	25
16.	Western blot.....	26
17.	Proliferación celular	26
18.	Esferoides	26
VIII.	Resultados.....	27
1.	Diseño de ARNi	27
2.	Restricción enzimática con BamHI y EcoRI	27
3.	Clonación de los vectores	28
4.	Digestión con MluI	29
5.	Estandarización de cIAP2.....	30
6.	Expresión de ARN mensajero de cIAP2	30
7.	Western blot	31
8.	Proliferación.....	31
9.	Esferoides.....	32
IX.	Discusión.....	33
X.	Conclusiones	37
XI.	Perspectivas	38
XII.	Bibliografía	39

Índice de figuras y gráficas

Figura 1: Tasas estimadas de incidencia y mortalidad por edad: ambos sexos.	3
Figura 2: Marcadores de cáncer.	4
Figura 3: Vías de apoptosis.	6
Figura 4: Estructura de las IAPs.	9
Figura 5: Vía de activación de NFκB y formación del complejo II.	11
Figura 6: Escisión de Dicer y procesamiento de ARNi por el complejo RISC.	13
Figura 7: Representación gráfica de los estadios celulares en un esferoide.	14
Figura 7: Restricción enzimática con BamHI y EcoRI.	27
Figura 8: Obtención del vector con el ARNi1.	28
Figura 10: Estandarización de cIAP2.	30
Figura 11: Expresión del ARNm de cIAP2.	30
Figura 12: Expresión de la proteína cIAP2.	31
Gráfica 1: Proliferación de HeLa control y HeLa ARNi2.	31
Gráfica 2: Curva de crecimiento de esferoides HeLa control y HeLa ARNi2.	32
Figura 13: Fotografías de esferoides a los días 2, 10 y 16 de crecimiento.	32

Índice de tablas

Tabla 1. Especificaciones de los ARNi empleados.	20
Tabla 2. Especificaciones de los primers empleados.	25

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNc - Ácido desoxirribonucleico complementario

AIF – Factor inductor de apoptosis

Apaf-1 – Factor activador de la proteasa apoptótica 1

ARN – Ácido ribonucleico

ARNi – Ácido ribonucleico de interferencia

ARNm – Ácido ribonucleico mensajero

Bcl-2 – Gen de células B2 de linfoma

Bid – Agonista de muerte que interactúa con el dominio BH3

BIR – Repetidos de proteínas inhibidoras de apoptosis baculovirales

BIR1 – Repetidos de proteínas inhibidoras de apoptosis baculovirales 1

BIR2 – Repetidos de proteínas inhibidoras de apoptosis baculovirales 2

BIR3 – Repetidos de proteínas inhibidoras de apoptosis baculovirales 3

BIRC3 – Proteína que contiene 3 dominios de proteínas inhibidoras de apoptosis baculovirales

CAD – Aspartato carbamoiltransferasa

CARD – dominio de reclutamiento de caspasas

c-FLIP – Inhibidor celular proteico de FLICE

cIAP1 – Proteína inhibidora de apoptosis 1

cIAP2 – Proteína inhibidora de apoptosis 2

dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfato

FADD – Proteína con dominio de muerte asociada a Fas

HtrA2/Omi – Serin peptidasa HtrA 2

HOIL-1L – Ubiquitin ligasa 1 hemo-oxidada por IRP2

HOIP – Proteína de interacción con HOIL-1L

HSP90 – Proteína de shock térmico de 90 kDa

IAPs – Proteínas inhibidoras de apoptosis

IARC – Agencia Internacional para Investigación del Cáncer

ICAD – Inhibidor de CAD

I κ B α – Inhibidor de factor nuclear kappa B cinasa subunidad alfa

I κ B β – Inhibidor de factor nuclear kappa B cinasa subunidad beta

I κ B γ – Inhibidor de factor nuclear kappa B cinasa subunidad gamma

I κ B ϵ – Inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas alfa

LUBAC – Complejo de montaje de la cadena de ubiquitina lineal

NF κ B – Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NIK – Cinasa inductora del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Abreviaturas de medidas y símbolos

p50 – subunidad p105 del factor nuclear NFκB

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

RelA – Factor de transcripción p65

RING – Gen nuevo realmente interesante

RIP1 – Proteína Serina-Treonina Cinasas de Interacción con Receptor 1

SHARPIN – Interactor de dominio RH asociado a SHANK

shRNA – Ácido ribonucleico en horquilla pequeño

siRNA – Ácido ribonucleico pequeño de interferencia

Smac/DIABLO – Segundo activador de la caspasa derivado de las mitocondrias/Inhibidor directo de la proteína de unión a apoptosis con bajo punto isoeléctrico

TAB – Proteína de unión a TAK1

TAK1 – Factor de crecimiento transformante beta activado por cinasa 1

TBP – Proteína de unión a TATA

TNFα – Factor de necrosis tumoral alfa

TRADD – Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 asociado al dominio proteico DEATH

TRAF2 – Factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

TRBP – Proteína de unión a ARN en respuesta a transactivación

UBA – Dominio asociado a ubiquitina

XIAP – Proteína inhibidora de apoptosis ligada a X

°C – Grados Celsius

μL – Microlitros

μM – Micromolar

kb – kilobases

kDa – kiloDalton

mA – miliAmperes

nm – nanómetros

pb – pares de bases

rpm – revoluciones por minuto

Tm – Temperatura de fusión

V – Volts

I. Resumen

La proteína cIAP2 es un inhibidor apoptótico que participa en la vía extrínseca de apoptosis al ubiquitinar RIP1. En caso de que no se realice este proceso, RIP1 no ubiquitinado puede formar un complejo citosólico con la molécula adaptadora FADD y caspasa 8, induciendo así apoptosis. Previamente, en el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, se han estudiado proteínas que pueden tener un rol en los mecanismos de evasión de apoptosis, los resultados obtenidos sugieren el análisis de cIAP2 basados en evidencia encontrada en los resultados obtenidos de un microarreglo con diferentes tratamientos que incluyen dexametasona y cisplatino. Este proyecto tiene como objetivo silenciar el gen BIRC3 mediante ARNi, para lo cual se diseñaron 2 shRNA cuya efectividad se midió a nivel de ARNm con la técnica de PCR y a nivel de la proteína cIAP2 con la técnica de Western blot. La efectividad encontrada de ambos ARNi no muestra resultados concluyentes a nivel de proteína, pero uno de ellos actúa a nivel de ARNm. También se efectuaron pruebas de proliferación y crecimiento de esferoides en el ARNi funcional a nivel de ARNm y no se encontró diferencia en el comportamiento de las células. Por lo anterior, se propone el análisis de apoptosis con ensayos que midan la actividad de caspasa 8 y de anexina V para determinar el efecto real que ejerce este ARNi.

II. Introducción

1. **Cáncer**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es un proceso incontrolado de crecimiento y diseminación de las células. Esta enfermedad compleja es susceptible de presentarse en cualquier órgano y si se extiende a otras regiones del cuerpo genera metástasis (WHO, 2016).

Este fenómeno ocurre porque la estabilidad génica de las células puede alterarse por diferentes mecanismos que no son capaces de ser reparados, generando mutaciones que conllevan disfunciones en las células, así como en su proliferación descontrolada (Weinberg, R. 2013).

1.1. Epidemiología del cáncer

En los últimos años, la investigación sobre cáncer ha incrementado por ser una patología que puede presentarse en cualquier individuo. La IARC desarrolló en los últimos años, hojas informativas donde se recopila información mundial sobre la epidemiología de esta patología. En estudios de 2012 se encontraron alrededor de 14.1 millones de casos nuevos de cáncer y 3.5 millones de muertes por cáncer, siendo mundialmente el cáncer de pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago, los más frecuentes en la población (IARC, Globocan, 2016).

Los mismos estudios revelan que en México alrededor de 148 mil personas presentan cáncer y 78 700 fallecieron por algún tipo de este, además los tipos de cáncer que más afectan a nuestra población (Figura 1) son el de mama, de próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón (IARC, Globocan, 2016).

Cada tipo de cáncer posee características que lo diferencian de otro, no obstante las células que dan lugar a los tumores, comparten la adquisición de capacidades biológicas que las lleva a convertirse en células cancerosas, dando lugar a lo que se conoce como marcadores de cáncer.

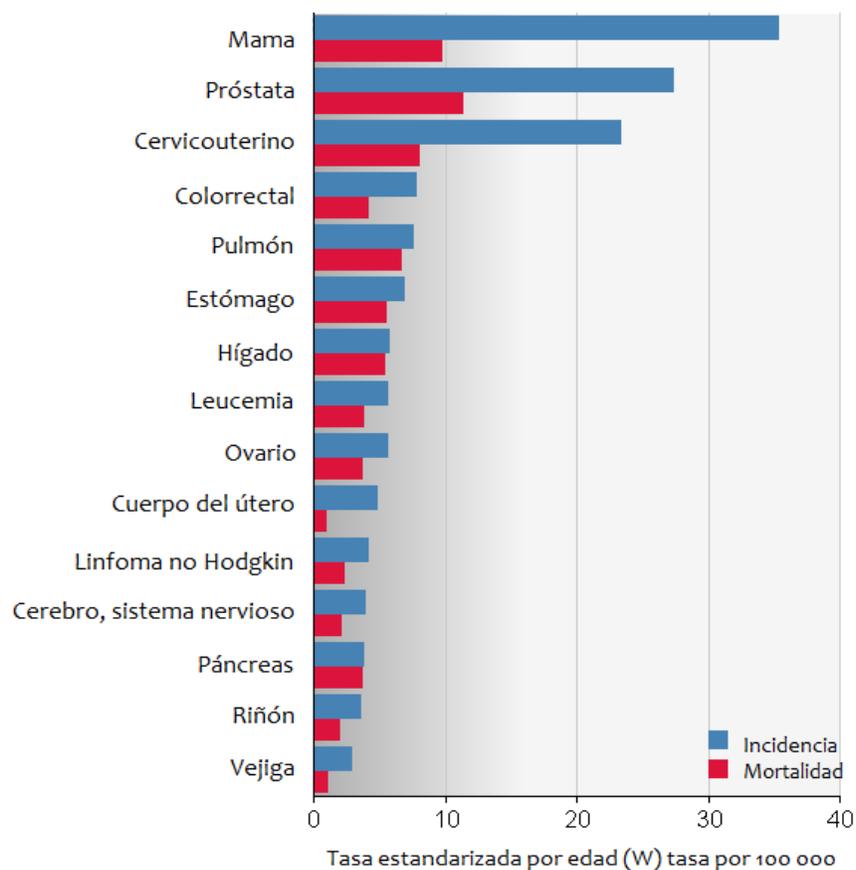


Figura 1: Tasas estimadas de incidencia y mortalidad por edad: ambos sexos. Una tasa es el número de nuevos casos o muertes por cada 100 000 personas al año. Una tasa estandarizada por edad es la tasa que tendría una población si tuviera una estructura de edad estándar. Imagen modificada de IARC, GLOBOCAN 2012 (2016).

1.2. Marcadores de cáncer

En 2000, Hanahan y Weinberg, (citado en Hanahan, D. y Weinberg, R., 2011) propusieron que la proliferación descontrolada, evasión de los supresores de crecimiento, actividad invasiva y metastásica, replicación ilimitada, inducción de angiogénesis y resistencia a muerte celular son características que diferencian a las células cancerosas de las normales. Pero en 2011, propusieron cuatro características más debido a la complejidad de los tejidos en las enfermedades neoplásicas, abarcando así un marco lógico para entender la diversidad del comportamiento de las células cancerosas. Estos nuevos parámetros incluyen la evasión de respuesta inmunológica, inflamación para la progresión tumoral, inestabilidad genómica y mutagénica y alteraciones energéticas (Hanahan, D. y

Weinberg, R., 2011). La Figura 2 muestra los marcadores empleados actualmente que determinan el comportamiento de células cancerosas.

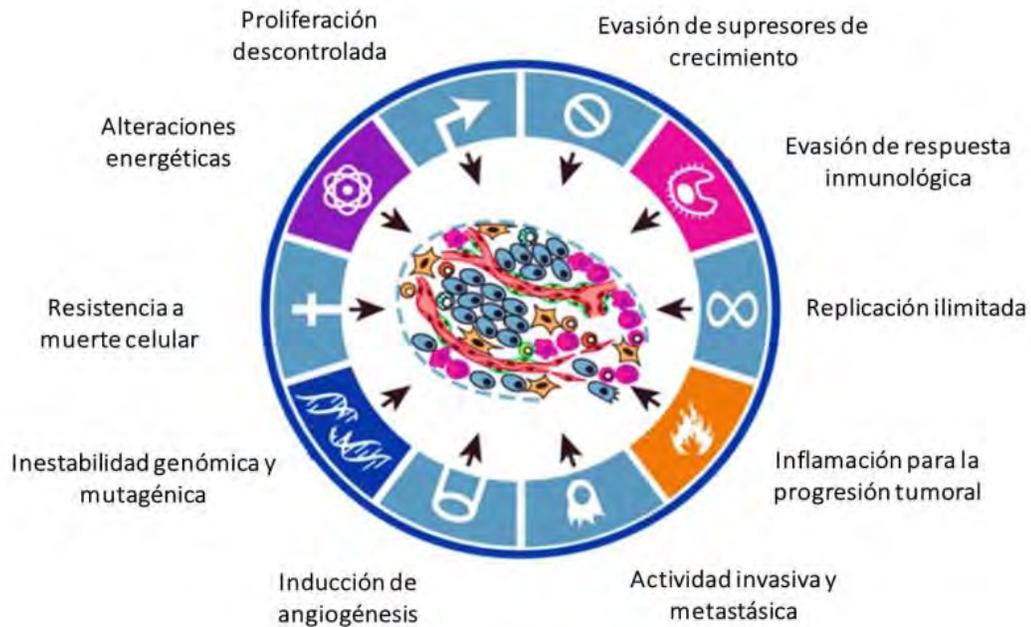


Figura 2: Marcadores de cáncer. Características que permiten identificar la complejidad del comportamiento de las células cancerosas. Modificado de Hanahan, D. y Weinberg, R., 2011

2. Apoptosis

Las células tienen un ciclo de vida, en el que evidentemente también dejan de realizar sus funciones lo que conlleva a la muerte de las mismas. Este proceso de muerte puede generarse por procesos como la necrosis y la apoptosis. La necrosis se origina después de que el tejido ha sufrido daño traumático o ha sido expuesto a toxinas, en este proceso no es requerida energía en forma de ATP, si no que se desregula la función celular que culmina con la lisis de la membrana celular. Esta lisis causa la liberación del contenido de la célula al espacio extracelular, lo cual induce a las células vecinas a la muerte y se produce una

reacción inflamatoria. La apoptosis es la muerte natural fisiológica de la célula y se encuentra programada para suceder (Jordán, J. 2003).

La apoptosis ocurre principalmente durante el desarrollo y en tejidos adultos sirve como mecanismo para mantener una población de células constante. Se origina por diferentes estímulos que pueden incluso activar el proceso necrótico. Lo que diferencia la aparición de dichos procesos es el tipo o grado de estimulación recibido por las células, a partir de los cuales se activa una cascada de caspasas formando una vía de señalización que culmina en la muerte celular. Las células que se someten a este fenómeno sufren alteraciones morfológicas como la picnosis, que es el resultado de la condensación de la cromatina. La picnosis genera un aumento brusco de la densidad intracelular que provoca un empacamiento de los organelos, formando así los cuerpos apoptóticos. También existe incremento de la concentración de calcio libre en citoplasma, modificaciones en la composición de la membrana y citoesqueleto (Elmore, S. 2007).

La apoptosis inapropiada da lugar al desarrollo a patologías neurodegenerativas, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y muchos tipos de cáncer donde se altera la función del gen p53 (Jordán, J.2003).

2.1. *Vías apoptóticas*

El mecanismo de apoptosis en células de mamíferos se ha explicado principalmente por los modelos de la vía intrínseca y el de la vía extrínseca, donde cada uno de ellos se activa dependiendo del tipo de estímulo que recibe la célula. Se sabe que existe una estrecha ligación entre ambas vías ya que hay moléculas de una vía que pueden influir en la otra. Ejemplo de ello ocurre durante la escisión de Bid mediada por caspasa 8. En la figura 3 se observa un esquema que representa a la vía intrínseca y extrínseca así como la culminación en una fase ejecutora que conduce a la muerte celular (Elmore, S. 2007; Winter, E. y col. 2014).

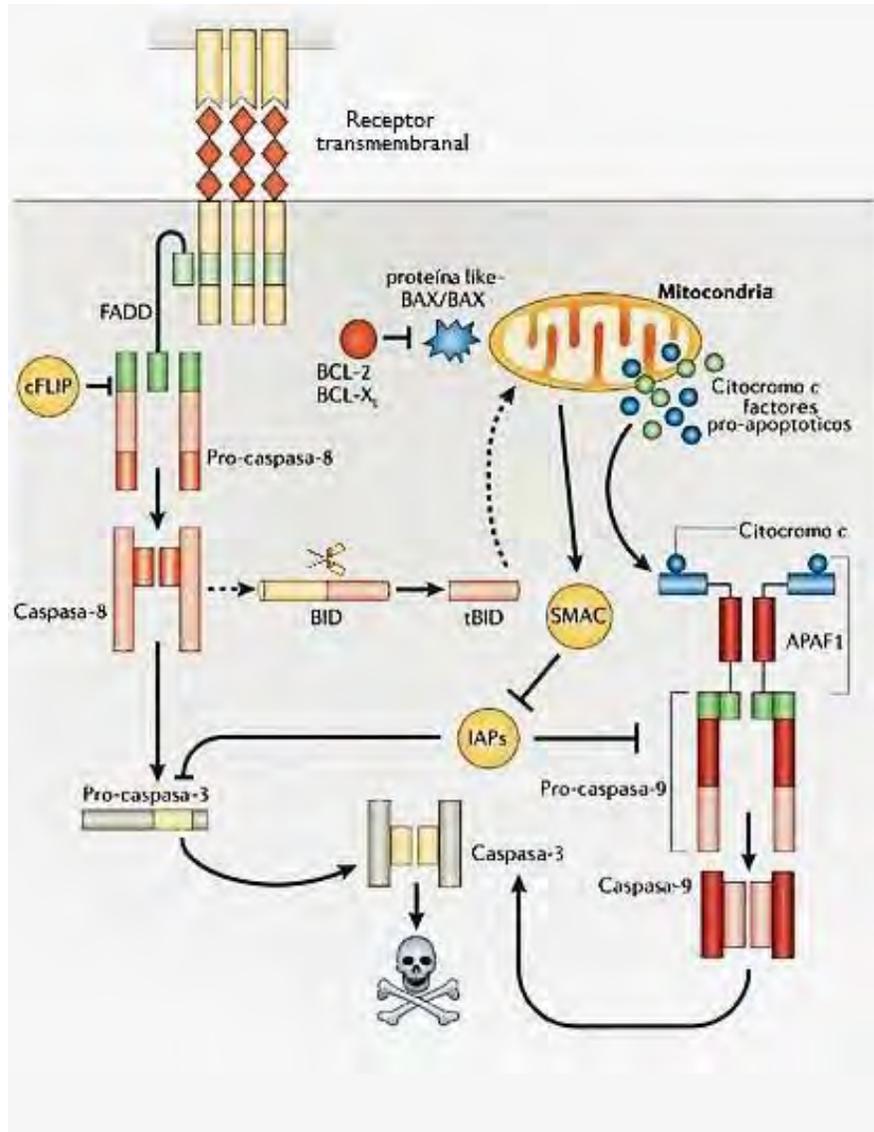


Figura 3: Vías de apoptosis. Esquematación de la vía extrínseca de la apoptosis regulada por la asociación de un ligando a su receptor y de la vía intrínseca mediada por cambios de permeabilidad en la membrana de la mitocondria. Ambas vías coinciden en la fase de ejecución que conduce a la muerte celular. Modificada de Hotchkiss, R. y Nicholson, D., 2006.

2.1.1. Vía extrínseca

Esta vía inicia por la unión de un ligando a su receptor transmembranal lo que activa a las caspasas iniciadoras, que culmina con la activación de las caspasas efectoras. Los receptores involucrados mejor caracterizados son los miembros de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), estas proteínas contienen

dominios de muerte que transmiten la señal de muerte de la superficie celular a las vías de señalización intracelulares (Indran, I. y col. 2011). Una vez unido el receptor a sus ligandos triméricos, FADD, una proteína adaptadora, se asocia a procaspasa 8 por la dimerización de su dominio de muerte, formando el complejo de señalización de inducción de muerte (death-inducing signaling complex, DISC) que permite la auto activación catalítica de pro-caspasa 8 induciendo la activación de la caspasa 8. La proteína c-FLIP puede actuar como inhibidora de esta vía al unirse con FADD y con la caspasa 8. Esta caspasa, puede paralelamente activar a Bid, proteína que al ser escindida, puede actuar en la vía intrínseca de la apoptosis al promover la salida de citocromo c y activar a la caspasa 9 (Cascales, M., 2003; Elmore, S., 2007). La vía extrínseca se encuentra regulada por las IAPs que pueden participar activando directa o indirectamente a las caspasas. La activación de esta vía dependerá de los niveles relativos de expresión de diversas proteínas, no solo de la variación de una de las proteínas de esta vía (Flusberg, D. y Sorger, P., 2015).

2.1.2. Vía intrínseca

Esta vía se caracteriza por no recibir estímulos mediados por receptores, si no que actúan estímulos que generan señales intracelulares causando cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que genera pérdida del potencial transmembranal mitocondrial y un poro que permite la liberación de proteínas pro-apoptóticas que se encuentran en el citosol intermembranal mitocondrial. Estas proteínas pueden dividirse en 2 categorías: a) proteínas activadoras de caspasas de manera dependiente como citocromo c y Smac/DIABLO y b) proteínas proapoptóticas como AIF y endonucleasa G. La liberación de citocromo C permite su unión con Apaf-1 y con ello la activación de la caspasa 9. Una vez formado este complejo de citocromo c, Apaf-1 y caspasa 9, se forma el apoptosoma que activa a las caspasas ejecutoras 3 y 7. Por otro lado, Smac/DIABLO inhibe la actividad de las IAPs permitiendo así el progreso apoptótico. En el caso de las proteínas proapoptóticas, estas son liberadas durante la apoptosis tardía, es decir una vez que las células han recibido la señal de muerte. Estas proteínas son traslocadas al núcleo; AIF ocasiona fragmentación del ADN y condensación de la cromatina nuclear periférica, a lo que se le conoce como condensación en fase I mientras que endonucleasa G

produce fragmentos de ADN oligonucleosomal (Elmore, S., 2007; Indran, I. y col. 2011).

La regulación de esta vía para la activación del apoptosoma, se encuentra controlada por las proteínas de la familia Bcl-2 que tienen capacidad tanto apoptótica como antiapoptótica (Cascales, M., 2003). La función mejor descrita de la participación de estas proteínas es la inhibición de la liberación de citocromo c al alterar la permeabilidad de la membrana (Elmore, S., 2007).

2.1.3. Fase de ejecución

En esta fase converge la vía intrínseca y extrínseca. Consiste en la activación de caspasas ejecutoras que activan a la endonucleasa citoplasmática y a las proteasas que degradan material nuclear, a las proteínas nucleares y a las citoesqueléticas. Las caspasas ejecutoras son caspasa 3, caspasa 6 y caspasa 7. Se considera a la caspasa 3 como la más importante y su función es que una vez activa, escinde a ICAD, liberando a CAD para degradar el material genético de la célula. La caspasa 3 también induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula para la formación de los cuerpos apoptóticos (Elmore, S., 2007).

3. Proteínas inhibidoras de la apoptosis

La familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) es uno de los reguladores más importantes de apoptosis ya que participan en la vía extrínseca inhibiendo a las caspasas directa o indirectamente. Poseen como característica principal la presencia de dominios conservados BIR cuya longitud es de aproximadamente 70 aminoácidos y cuya estructura es de 4 a 5 alfa hélices y 3 hojas beta plegadas. Las IAPs, poseen también un dominio CARD caracterizado por tener una estructura de 6 a 7 alfa hélices antiparalelas; un dominio UBA que se compone por 3 alfa hélices y un dominio RING, cuya función no ha sido esclarecida totalmente en todas las proteínas de esta familia. Las IAP participan en procesos como ciclo celular, inmunidad, inflamación y ubiquitinación. Se han identificado ocho miembros de esta familia, siendo XIAP y survivina los más estudiados por su desregulación en procesos cancerosos (Uniprot, 2016; Pfam,

2017). En la Figura 4 se observa una representación gráfica de la estructura de las IAPs y los dominios que posee.

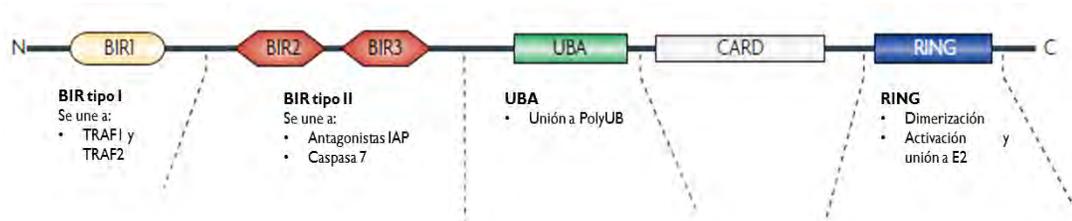


Figura 4: Estructura de las IAPs. Esquematación de los dominios que presentan usualmente las IAPs y la función de cada uno. Modificado de Hansen, M. y Meier, P., 2010

3.1. *BIRC3*

Uno de los genes encargados de codificar para una proteína perteneciente a la familia de IAPs es BIRC3. Este gen fue mapeado al cromosoma 11 en 1996 por Liston (Liston, 1996 citado en OMIM, 601721). Posteriormente empleando hibridación por fluorescencia *in situ*, Rajcan-Separovic (Rajcan-Separovic, 1996 citado en OMIM, 601721) encontró que su ubicación específica se encuentra en el cromosoma 11q22. Se constituye de 22 031 pares de bases y 10 exones. Genera un transcrito de 6.4 kb y codifica para la proteína cIAP2 (Mathijs, B. y Marynen, P, 2001).

3.1.1. *Generalidades de cIAP2*

Esta proteína se encuentra en el citoplasma y en el núcleo celular y se conforma por 604 aminoácidos. cIAP2 tiene un peso molecular de 68 kDa, posee 3 motivos repetidos BIR: BIR1, BIR2 y BIR3, un dominio CARD y un dominio RING. Esta proteína se encuentra altamente expresada en pulmón fetal y riñón; y en tejido adulto se expresa en tejidos linfoides, bazo, timo y linfocitos de sangre periférica. Interactúa con Smac/DIABLO y con HtrA2/Omi, lo que genera inhibición de su actividad como supresor apoptótico (Uniprot, 2016). cIAP2 regula, junto a cIAP1, la vía extrínseca de la apoptosis gracias a su actividad como ubiquitin ligasa, que permite la activación de las caspasas de manera indirecta (De Almagro, D. 2012).

3.1.2. Funciones de cIAP2

Aunado a la regulación apoptótica, el papel de cIAP2 y otras IAPs, también radica **en la regulación positiva la vía canónica de NFκB al funcionar como E3 ubiquitin ligasa** promoviendo la ubiquitinación de proteínas como RIP1 y NIK (De Almagro, D., 2012).

La vía canónica de NFκB (Figura 5) inicia por la **estimulación de TNFα**, quien al unirse a su receptor, permite el reclutamiento del complejo TRADD, TRAF2, y de las proteínas cIAP1, cIAP2 y RIP1. cIAP1 y cIAP2 se unen mediante su dominio BIR1 al dominio TRAF-N de TRAF2. Esta unión provoca el reclutamiento de trímeros de TRAF2 que dimerizan cIAP1 o cIAP2 activando su función como E3 ligasa y ubiquitinando a RIP1. La importancia de esta última proteína es que **permite la unión de la cinasa IκB, el complejo IKK (formado por IKKα, IKKβ/modificador esencial de NFκB y IKKγ), factor de crecimiento transformante β activado por cinasa 1, el complejo TAK1-TAB y el complejo LUBAC (formado por las subunidades SHARPIN unida a HOIL-1L y HOIP)**. Esto genera la ubiquitinación **de IKKγ por LUBAC. IKKγ y el complejo IKK son reclutados a las cadenas de poliubiquitinación de RIP1 que genera proximidad al complejo TAK1 cinasa fosforilado y activando IKKβ, que activa la fosforilación de IκBα generando una señal para enviar a proteosoma a esta proteína. En células no estimuladas, IκBα secuestra los factores de transcripción de NFκB y la degradación de IκBα libera p50 y RelA permitiendo su traslocación al núcleo y con ello la transcripción de éstos** (De Almagro, D., 2012).

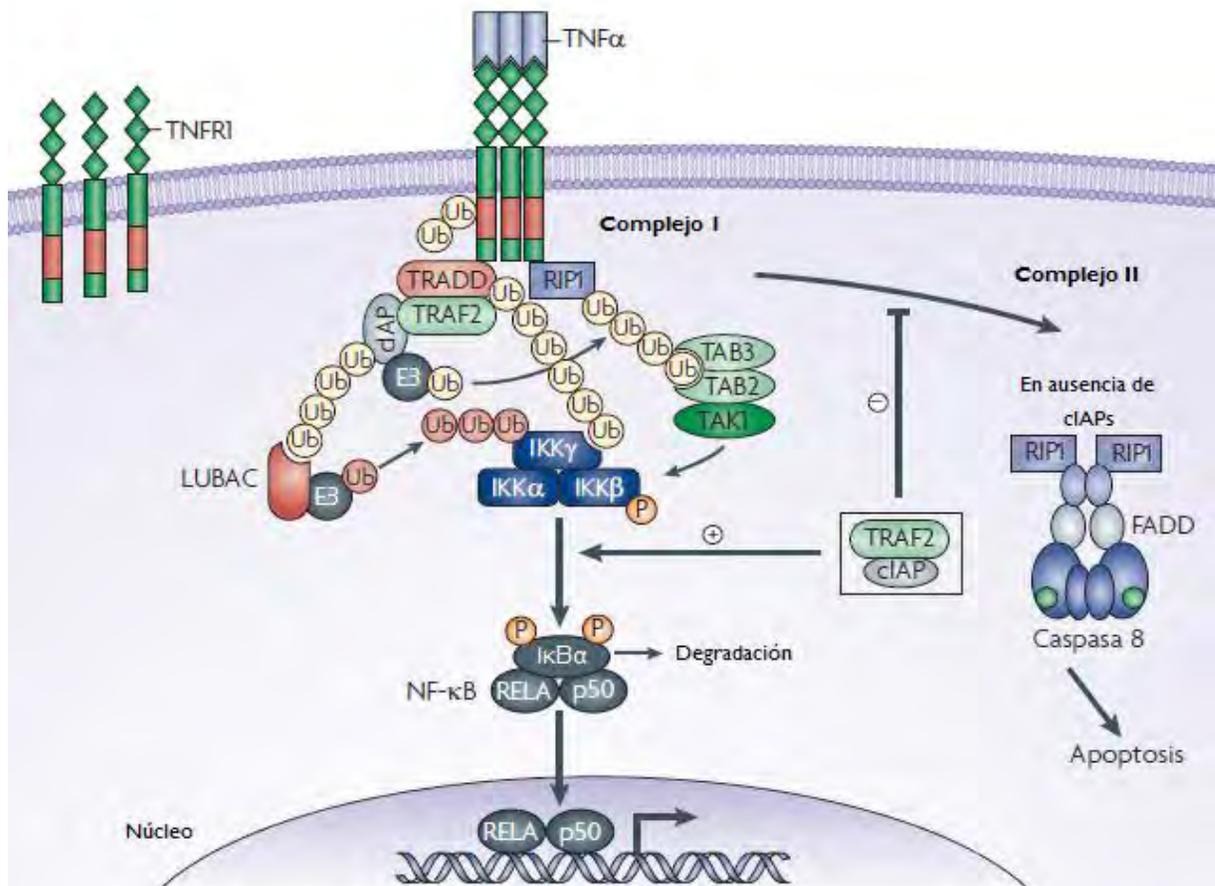


Figura 5: Vía de activación de NFκB y formación del complejo II. Esquematación que muestra la cascada de activación de diferentes proteínas y complejos que dan lugar a la activación de la vía canónica de NFκB así como la formación del complejo que permite apoptosis en las células cuando las cIAPs no participan. Modificado de Hansen, M. y Meier, P., 2010.

3.1.3. cIAP2 en apoptosis

Para determinar el papel específico en apoptosis de cIAP2, se ha estudiado la función de su dominio RING. Se ha demostrado que el dominio RING está asociado a ubiquitinación de cIAP1 y XIAP (Yang, Y. y col. 2000). También, se le han asociado funciones de ubiquitin ligasas E3 (Bertrand, M., et al, 2008), cuya participación se da principalmente al promover la ubiquitinación de RIP1.

Los dominios BIR que poseen las IAPs, son los responsables de la actividad antiapoptótica de esta familia ya que pueden unirse a la caspasa 3 y a caspasa 7 activadas e inhibir sus funciones, además algunas proteínas de esta familia inhiben caspasa 9 activada y al unirse a pro-caspasa 9 previenen la estimulación apoptótica. En el caso de cIAP2, se ha encontrado una participación en la vía extrínseca de apoptosis pero sus dominios BIR no se unen físicamente a las caspasas, sino que su función como ubiquitin ligasa dada por el dominio RING, le

permite ubiquitinar RIP1 (Figura 5), en caso de que no se realice este proceso, RIP1 no ubiquitinado puede formar un complejo citosólico con la molécula adaptadora FADD y caspasa 8, induciendo así apoptosis (De Almagro, 2012).

4. **ARN de interferencia**

El término de ARN de interferencia (ARNi) fue acuñado en 1998 por Fire, A. y colaboradores, refiriéndose a este como una herramienta capaz de manipular la expresión génica mediante la hibridación del ARN insertado a una secuencia específica de ARNm que impide la transcripción del mensajero. Los experimentos que llevaron a cabo en *Caenorhabditis elegans* permitieron conocer que la inserción de ARNi de doble cadena es más efectivo para la inhibición del ARNm que ARNi de una sola cadena, siendo hasta dos veces en orden de magnitud más potente, lo que en años posteriores sirvió como referencia para el desarrollo de éstos como herramienta de inhibición por su alta especificidad y efectividad (Fire, A. 1998).

La importancia que generó el descubrimiento despertó el interés para ser probado en células de mamíferos. Elbashir, SM. y colaboradores en 2001 establecieron que los dúplex de ARNi pequeños (siRNA) de longitud de 21 y 22 nucleótidos, generados por la escisión de la ribonucleasa III en ARN de doble cadena, son mediadores en el proceso de degradación de secuencias específicas de ARNm. Lo anterior se comprobó mediante la experimentación en las líneas celulares HeLa y en células embrionarias de riñón humano, y sus resultados indican que este tipo de ARNi es una herramienta útil para el silenciamiento de genes (Elbashir SM, 2001).

4.1. *Fisiología de los ARNi*

Los ARNi son el resultado de un mecanismo en el que la célula procesa ARN de doble cadena mediante la enzima Dicer, un tipo de RNasa III. Esta enzima escinde la secuencia y genera un siRNA de doble cadena de aproximadamente 21-23 nucleótidos que se une al complejo RISC (Complejo de silenciamiento inducido por ARNi) conformado por: Dicer, siRNA de doble cadena previamente

escindido, proteína argonauta, HSP90 y TRBP. Posteriormente TRBP, una proteína de unión al siRNA de doble cadena, orienta y posiciona la cadena correcta para que la proteína argonauta, que se encuentra en conformación abierta por su interacción con HSP90, se una a la hebra de siRNA monocatenaria y por reconocimiento de pares de bases, se asocia a su ARNm, al ser reconocido se realiza una escisión en medio de la región homóloga y el ARNm es degradado. En el caso de ARNi sintéticos, como los shRNA, se procesan de igual manera, en donde Dicer los escinde y forma siRNAs de doble cadena. (Meister, G. 2013; Mocellin, S. y Provenzano, M. 2004). La Figura 6 es una representación del proceso de escisión del ARN de doble cadena hasta la formación del complejo RISC.

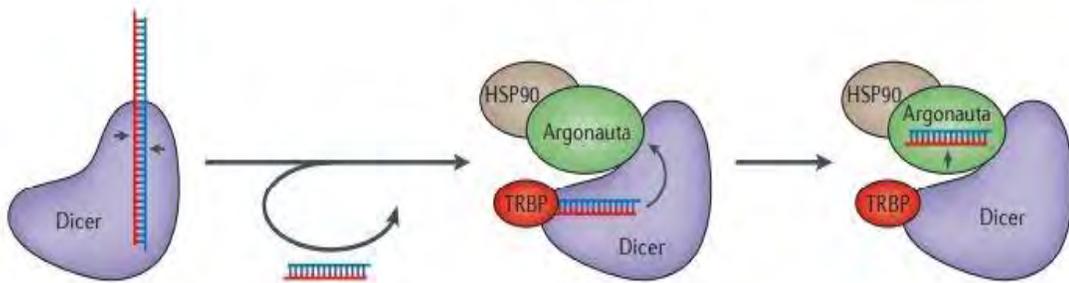


Figura 6: Escisión de Dicer y procesamiento de ARNi por el complejo RISC. Modificado de Meister, G., 2013.

5. Esferoides como modelo celular

Los modelos tridimensionales de cultivos celulares surgen para mejorar las condiciones fisiológicas y el microambiente de un sistema biológico ya que presentan un alto grado de complejidad estructural y homeostasis, similar a la que presentan los órganos y tumores (Bartholomeusz, G. y Rao, A. 2014).

Los aspectos espaciales y físicos de cultivos en tres dimensiones afectan la transducción de señales del exterior al interior de las células, influyen en la expresión de genes y en el comportamiento celular. A diferencia de los cultivos

en monocapa, la formación de estos agregados celulares o esferoides permiten conocer las interacciones célula-célula cuando se realizan en suspensión, o interacciones célula-matriz, cuando se realizan empleando una matriz como soporte (Ivanov, D. y Grabowska, A. 2016; Edmonson, R. y col. 2014).

Los esferoides se constituyen por capas de células en diferentes estadios. El núcleo del esferoide posee una cantidad limitada de oxígeno, factores de crecimiento y nutrientes del medio, por lo que se encuentra en etapa necrótica. Las capas más externas reciben una gradiente distinta al núcleo, siendo más accesible la entrada de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento por lo que las células se encuentran viables en etapa quiescente y finalmente se ubica una zona de células proliferativas que tienen contacto directo con el medio (Lin, RZ. y Chang, HY. 2008).

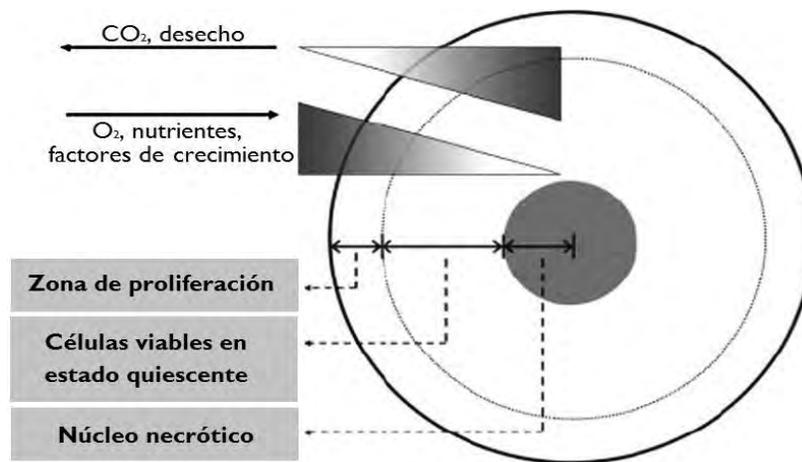


Figura 7: Representación gráfica de los estadios celulares en un esferoide. El esquema muestra la gradiente de entrada de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento y la salida de los desechos celulares y CO₂ en las distintas zonas que conforman el esferoide. Modificado de Lin, RZ. Y Chang, HY. 2008.

III. Antecedentes

Para determinar el papel que juega cIAP2 en supervivencia o apoptosis celular se han efectuado estudios en diferentes modelos celulares inhibiendo exitosamente la función de cIAP2 en diferentes tipos de cáncer, como linfoma de Hodgkin clásico, cáncer de ovario y cáncer de mama (Dürkop, H., 2005; Runnebaum, I. y Brüning, A., 2005).

Dada la importancia de cIAP2 en el proceso apoptótico y la variación de su expresión en diferentes tipos de cáncer, en el laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer se ha estudiado esta proteína con un ensayo que determinó los niveles de expresión de ARNm en muestras de pacientes con cáncer cervicouterino y muestras control, y a pesar de no encontrar variación entre ambos tejidos (Espinosa, M. y col. 2006), surgió un proyecto donde se cree que la proteína cIAP2 ejerce una actividad protectora a la apoptosis generada con cisplatino (CP) cuando las células se encuentran estimuladas por dexametasona (DEX). Como parte del proyecto, se realizó un microarreglo con células HeLa sometidas a diferentes tratamientos que combinan la acción de DEX y CP, así como sus efectos individuales. El análisis de este microarreglo revela que la expresión del gen BIRC3 se encuentra desregulada en al menos 3 de los 4 tratamientos, lo que sugiere la participación de cIAP2 en este proceso de evasión apoptótica. De ahí la importancia de retomar el gen BIRC3 y silenciarlo, con el fin de proporcionar una herramienta que permitirá concluir el estudio global.

IV. Justificación

En el grupo de trabajo del laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, se ha evaluado el efecto protector de la DEX en apoptosis inducida por CP en la línea celular HeLa, así como el papel de diferentes proteínas reguladoras de apoptosis para determinar mecanismos de evasión de la muerte celular. Se sabe que el tratamiento con glucocorticoides durante la quimioterapia es capaz de inhibir la apoptosis generada por agentes quimioterapéuticos (Gassler, N y col. 2005; Hou, W. y col. 2014). De ello se depende la investigación de los mecanismos por los que la DEX es capaz de proteger a las células de apoptosis.

Como parte del estudio en el laboratorio, también se ha analizado la expresión de Noxa, PUMA y Snail como proteínas involucradas en la regulación de apoptosis, pero los experimentos realizados no indican su participación en la evasión apoptótica (Ortiz, E. 2015), por lo que se ha sugerido el análisis de cIAP2 basados en evidencia encontrada en los resultados obtenidos de un microarreglo con diferentes tratamientos que incluyen DEX y DEX/CP. La relevancia de este estudio es determinar la expresión del ARNm de BIRC3 y de la proteína cIAP2 al inhibir el gen BIRC3 mediante ARNi ya que determinar el funcionamiento de ambos ARNi es fundamental para dar continuidad al proyecto.

V. Objetivos

1. Objetivo general

Realizar el silenciamiento del gen BIRC3 en la línea celular HeLa, empleando dos ARNs de interferencia (ARNi) para determinar la eficiencia de cada uno.

2. Objetivos particulares

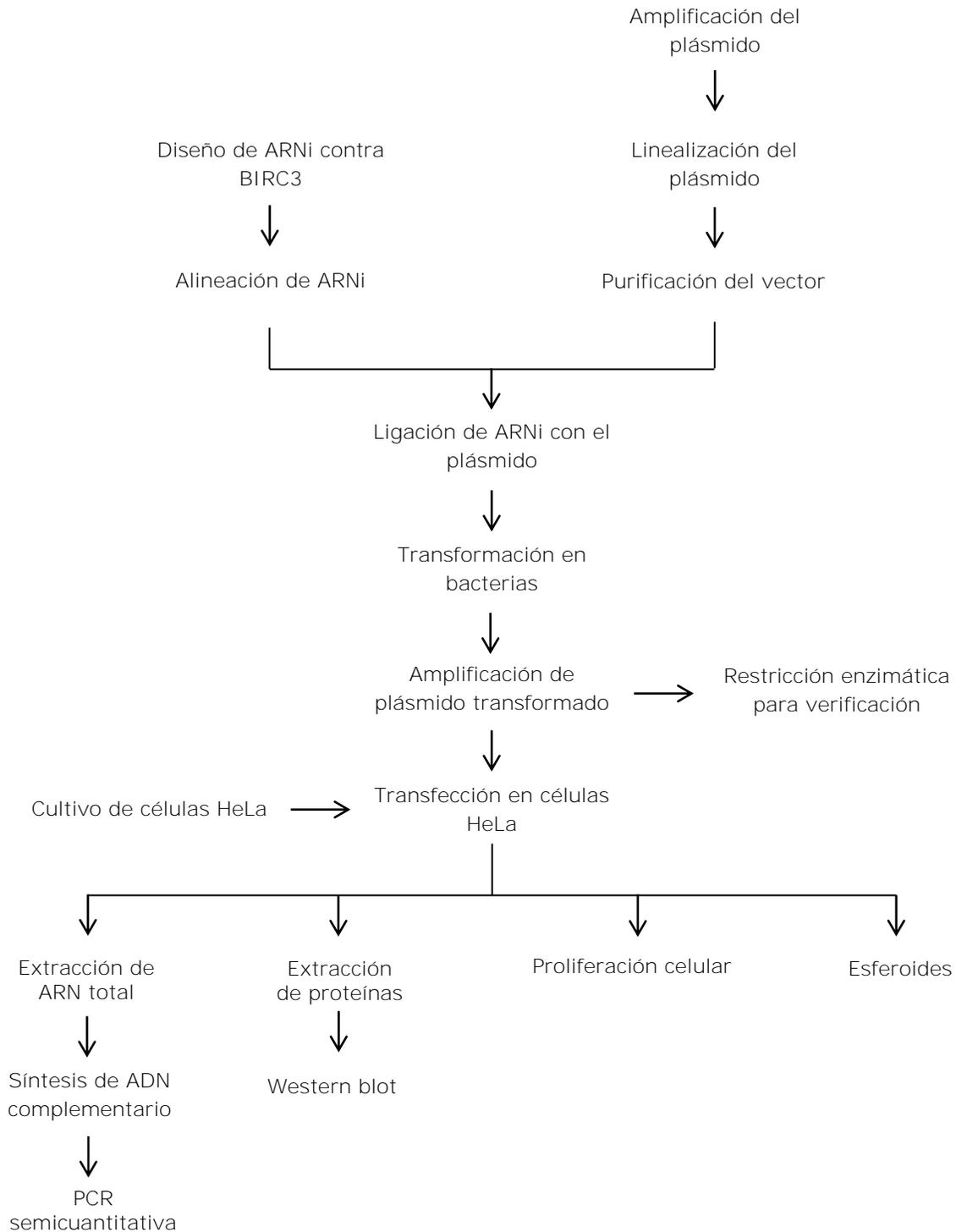
- Diseñar dos ARNi mediante herramientas bioinformáticas para inhibir al gen BIRC3 en la línea celular HeLa.
- Construir un vector para cada ARNi dirigido contra BIRC3 para transfectarlo en células HeLa.
- Analizar la eficiencia de los ARNi a nivel de ARNm mediante PCR semicuantitativo y a nivel de proteína mediante la técnica de Western blot.
- Determinar el efecto del ARNi mediante la técnica de proliferación celular en cultivo de monocapa y mediante el crecimiento de esferoides, tanto de las células control como las transfectadas con el ARNi dirigido contra BIRC3.

VI. Hipótesis

Si se inhibe la traducción de la proteína cIAP2, la formación del complejo RIP1-FADD no estará regulado negativamente y activará a caspasa 8, generando un incremento de la apoptosis.

VII. Metodología

1. Esquema de trabajo



2. Cultivo celular

Se empleó la línea celular HeLa (Número ATCC CCL-2) derivada de adenocarcinoma de cérvix que presenta virus del papiloma humano 18 (HPV-18).

Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 5%. Se incubaron a 37°C y en condiciones de 5% de CO₂.

3. Diseño de ARN de interferencia dirigido contra BIRC3

Se empleó la herramienta RNAi designer de Clontech, donde a partir de la secuencia de referencia NM_001165.4 de cIAP2 se obtuvieron dos regiones blanco para el diseño de los ARNi y se les añadió sitios de restricción para las enzimas BamHI, EcoRI y MluI. Se analizaron con la herramienta de alineación BLAST para verificar homología con el transcrito de BIRC3.

Tabla 1. Especificaciones de los ARNi empleados		
Oligos	Secuencia	Tm
ARNi1	Top 5'- AATTCACGCGTAAAAAAGCCACAGTGACTTGCTTAT TCTCTGAATAAGCAAGTCACTGTGGCG-3'	69.0°C
	Bottom 5'- GATCCGCCACAGTGACTTGCTTATTTCAAGAGAATA AGCAAGTCACTGTGGCTTTTTTACGCGTG-3'	69.3°C
ARNi2	Top 5'- GATCCATGGCATCCTGATGGCTTATTCAAGAGATAA GCCATCAGGATGCCATTTTTTACGCGTG-3'	69.3°C
	Bottom 5'- AATTCACGCGTAAAAAATGGCATCCTGATGGCTTA TCTCTGAATAAGCCATCAGGATGCCATG-3'	69.09°C

4. Alineación de oligos para el ARN de interferencia

Los ARNi se llevaron a una concentración de 100 µM para su uso, añadiendo TE como buffer. Una vez resuspendidos, se hizo una mezcla entre la hebra codificante y la complementaria en relación 1:1 para que la concentración final

del oligo de doble cadena fuera de 50 μM . Posteriormente se llevaron al termociclador en intervalos de temperatura de 95°C durante 30 segundos, 72°C por 2 minutos, 37°C por 2 minutos, 25°C por 2 minutos y finalmente se conservaron a -20°C hasta su uso.

5. Amplificación de plásmido

Se empleó la técnica de MidiPrep con el kit HiSpeed Plasmid de QIAgen. A partir de un precultivo con bacterias *Escherichia coli* DH5a competentes, se obtuvo un pellet que fue sometido a lisis celular y a lavados para obtener ADN del plásmido, el cual se eluyó en 500 μL de agua miliQ.

6. Digestiones con enzimas de restricción específicas

Se realizaron cortes con enzimas de restricción para linealizar el plásmido y cortar el gen insertado que no es de interés para el experimento. Primero se realizó una digestión con la enzima BamHI, que se llevó a un volumen total de 50 microlitros, donde 35.5 μL corresponden a ADN plasmídico, 1 μL de enzima BamHI (20 000 U/mL), 5 μL de buffer NEB 3.1, y 8.5 de agua miliQ. La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche.

La segunda restricción se realizó con la enzima EcoRI, que se llevó a un volumen total de 50 μL , 26 μL corresponden a ADN plasmídico digerido, 1 μL a la enzima EcoRI (20 000 U/mL), 5 μL de buffer EcoRI, y 18 μL de agua miliQ. La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche.

7. Purificación del vector

Para determinar si el vector se linealizó y se separó el gen que no es de interés para el experimento, se realizó un gel de agarosa al 1% donde se corrieron el marcador de peso molecular, el plásmido sin digerir, una muestra con dilución 1:10 del plásmido linealizado y 40 μL del plásmido linealizado. Una vez observado el fragmento correspondiente al vector linealizado se realizó la extracción de ADN en gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction de QIAgen. El fragmento obtenido de agarosa se lavó con 3 volúmenes de buffer QG, posteriormente se incubó en el termomix durante 12 minutos a 50°C hasta

disolver el gel y se añadió 1 volumen de isopropanol. La mezcla obtenida se colocó en una columna y se centrifugó a 13 000 rpm durante un minuto. Se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con 750 μ L de buffer PE que se dejó reposar durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm durante un minuto. Para la obtención de ADN por elución, se añadieron 30 μ L de agua miliQ al centro de la membrana de la columna dejando reposar durante un minuto y finalmente se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto.

Una segunda extracción se realizó a partir de restricción enzimática con EcoRI, donde el volumen de ADN obtenido fue de 30 μ L. Se determinó la concentración del plásmido después de la segunda restricción empleando el equipo NanoDrop.

8. Ligación

Para ligar el oligo de doble hebra con el plásmido previamente linealizado, se realizó una dilución del oligo alineado a una concentración de 0.5 μ M, posteriormente se realizaron 2 reacciones de ligación para cada ARNi. Se preparó una master mix con 14 μ L de plásmido linealizado (25 ng/ μ L), 3 μ L de buffer de ligasa, 1 μ L de BSA (10 mg/mL), 9 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L enzima ligasa (5U/mL). A cada tubo de ligación se le añadió 1 μ L del ARNi correspondiente y se llevaron a un volumen final de 15 μ L. Las reacciones se incubaron 3 horas a temperatura ambiente.

9. Transformación

Se realizó un precultivo con bacterias *Escherichia coli* DH5a competentes en medio LB. También se preparó solución T mezclando 500 μ L de solución T (A) con 500 μ L de solución T (B).

Para realizar 2 transformaciones se tomó una porción de bacterias de 4x4 mm del medio previamente sembrado, se inoculó en 4.5 ml de medio C y se incubó durante 2 horas a 37° con movimiento. Al finalizar la incubación se centrifugaron las bacterias en la nanofuga durante un minuto y el pellet obtenido se resuspendió en 600 μ L de solución T, se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó 1 minuto en la nanofuga para después resuspender el pellet en 240 μ L de sol T y se incubó nuevamente 5 minutos. Durante esta incubación, en tubos

de 1.5 ml se agregaron 3 μL de la mezcla de ligación a cada tubo y se dejaron en hielo por 2 minutos. Posteriormente se adicionaron 50 μL de las células preparadas a cada tubo con la mezcla de ligación y se incubaron 5 minutos en hielo. Finalmente se sembró cada contenido de los tubos en agar LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en placas y se dejaron en incubación toda la noche a 37°C.

Al siguiente día se seleccionaron 5 colonias de las transformaciones con ARNi1 y 5 colonias transformadas de ARNi2. Cada una se sembró en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

10. Amplificación de plásmido transformado

Se empleó el kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN. A partir de un precultivo con células *Escherichia coli* DH5 α competentes transformadas con 2 ARNi diferentes, se obtuvo un pellet que se sometió a lisis celular y a lavados para obtener ADN de las colonias aisladas y se eluyó con 50 μL de agua milliQ, se midió la concentración de ADN para cada colonia con el equipo NanoDrop y se eligieron las colonias con mayor concentración de ADN y mejor calidad para verificar la transformación.

Para verificar que la transformación se efectuó en las colonias, se realizó una digestión enzimática del ADN obtenido de las células transformadas con la enzima MluI, donde se emplearon 500 ng de ADN y se llevaron a un volumen final de 20 μL , adicionando 1 μL de enzima MluI, y 2 μL de buffer NEB 3.1. Se elaboró un gel de agarosa al 2% con las muestras para verificar cuáles eran transformantes al comparar el ADN plasmídico no digerido con el respectivo ADN aislado de las colonias. Posteriormente se seleccionó la colonia con mayor concentración de ADN de cada transformación (1 para el ARNi1 y otra para el ARNi2), y se realizó un precultivo en medio LB, para finalmente purificar el ADN plasmídico con el kit HiSpeed Plasmid Midi kit.

11. Transfección

Para medir la expresión de cIAP2, se sembraron 200 000 células HeLa por pozo en cajas de 35 mm. Una vez alcanzada la confluencia de 80%, las células se

transfectaron con tres vectores: 1) Control con vector LUC, 2) ARNi1 y 3) ARNi2. En cada transfección se emplearon 150 μ l de medio DMEM sin suero y 10 μ L de lipofectamina que se incubaron durante 5 minutos, también se prepararon 3 soluciones que contenían 150 μ L de medio sin suero y su respectivo ADN a concentración de 2 μ g/ μ l. Posteriormente se mezcló la reacción de lipofectamina con la de ADN y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Cada caja fue sembrada con los 300 μ L obtenidos y se añadieron 400 μ L más por cada caja. Se incubaron durante 4 horas a 37°, con suministro de CO₂, para después retirar el medio y añadir 2 ml de medio DMEM con 5% de SFB.

Dos días después de la transfección, se añadió puromicina como marcador de selección a una concentración de 10 μ g/ μ l. Se incubaron a 37°C con suministro de CO₂ durante 1 semana.

12. Extracción de ARN total

El ARN total de las células se extrajo con el reactivo TRIzol. Las células se homogenizaron con el reactivo, y se adicionó cloroformo, en esta etapa se obtuvieron dos fases, la fase acuosa tratada con isopropanol y etanol con agua dietil-pirocarbonato para la obtención de ARN, el cual se disolvió en agua miliQ. Posteriormente se cuantificó mediante el equipo NanoDrop con el fin de obtener su relación 260/280 y su concentración.

13. Síntesis de ADN complementario

Se empleó la técnica de RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) para sintetizar ADNc a partir del ARN obtenido. La síntesis se efectuó partiendo de una concentración de 2000 ng/ μ L de ARN total y se empleó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription. Para ello se hizo un master mix que contiene buffer de reacción, una mix con dNTPs, hexámeros sintetizados al azar, la enzima transcriptasa reversa y agua libre de nucleasas, así como el ARN correspondiente a cada muestra, obteniendo un volumen total por tubo de 20 μ L. Posteriormente las 3 reacciones que corresponden al control, y los dos ARNi se incubaron 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. Los tubos se guardaron a -20°C hasta su uso.

14. Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativo (PCR)

Para verificar la presencia de IAP2 en las células transfectadas, se amplificó el ADNc haciendo uso de los reactivos para esta técnica: buffer de reacción con cloruro de magnesio, dNTPs, primers específicos para el mensajero de cIAP2, polimerasa AmpliTaq Gold, y ADNc normalizado para cada muestra, llevados a un volumen final de 25 μ L por reacción. De acuerdo al diseño de los primers, se establecieron los ciclos de reacción, así como las T_m. La expresión del ARNm se normalizó con la expresión de TBP. Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Oligos	Secuencia	T _m
TBP	Sentido 5'-CCAGACTGGCAGCAAGAAAAT -3'	55.9 °C
	Antisentido 3'-CCTTATAGGAACTTCACATCACAGC -5'	55.6 °C
cIAP2	Sentido 5'-GAATACTCCTGTGATTAATGCTGCCGTGG -3'	60.8 °C
	Antisentido 3'-TCTCTTGCTTGTAAGACGTCTGTGTCTTC -5'	59.8°C

15. Extracción de proteínas

Se realizó la extracción con el buffer de lisis RIPA, para ello se rasparon las células de una caja de cultivo y se centrifugaron en la nanofuga durante 1 minuto para obtener un pellet. El sobrenadante se descartó y al pellet se le añadieron 100 μ L de la mezcla que contiene el reactivo RIPA al 1X e inhibidores de proteasa 1X, el pellet se resuspendió con ayuda de una jeringa de 1 ml y se incubó en hielo por 10 minutos. Pasada la incubación se centrifugaron a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se separó y guardó a -20°C.

16. Western blot

Se efectuó la estandarización de proteínas, partiendo de un gel de acrilamida al 12%. Las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 99°C. Se cargaron 4 carriles, 1 carril con marcador de peso molecular y 3 carriles del gel con las muestras. La corrida se efectuó a 120 V y 20 mA por 1 hora 45 minutos. Una vez obtenido el gel, se realizó la transferencia a 15 V por 15 minutos, y tinción del gel obtenido, después se realizó el bloqueo de la membrana con el anticuerpo **primario "cIAP2 rabbit Mab" en una dilución 1:1000**. Transcurrida la incubación se realizaron lavados para eliminar el exceso de solución de bloqueo y anticuerpo y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti conejo, posteriormente se eliminó el exceso con lavados y se reveló la membrana por luminiscencia. La normalización se realizó partiendo de un gel de proteínas al 12% que fue teñido con azul de Coomasie.

17. Proliferación celular

En una placa de 96 pozos se sembraron 100 células/ 200 µL por pozo, en 48 pozos, correspondientes a un seguimiento de 8 días de experimentación por triplicado. Las células sembradas corresponden al control y a las transfectadas con el ARNi2.

La fijación con etanol al 70% se realizó cada 2 días durante 8 días y una vez fijadas se tiñeron con cristal violeta. Finalmente se adicionó ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia a 570 nm.

18. Esferoides

Se sembraron 1 000 000 de células control y de células transfectadas con ARNi2 en botellas de 12.5 cm², con medio Leibovitz y 5% de SFB en incubación a 37°C sin suministro de CO₂. Se realizó cambio de medio cada 2 días y se tomaron fotografías antes de realizar el cambio de medio para determinar el tamaño promedio de los esferoides.

VIII. Resultados

1. Diseño de ARNi

Un paso crucial para la efectividad de los ARNi es el diseño de estos, para ello primero se determinaron las secuencias blanco con la herramienta RNAi Target Sequence Selector de Clontech, cuya selección se basó los criterios establecidos por diversos autores (Reynolds, A. y col., 2004, Elbashir, SM y col., 2001):

- a) Porcentaje de CG de 36 a 52%
- b) Estabilidad de la Tm en los extremos 3´ y 5´
- c) Repetición de bases consecutivas menor a 4
- d) Evitar secuencias homólogas a genes diferentes a BIRC3.

Posteriormente con la herramienta shRNA Sequence Designer de Clontech, se diseñaron los ARNi añadiendo los extremos de reconocimiento para las enzimas EcoRI y BamHI del vector pSIREN retro Q, así como un sitio de restricción para MluI y la secuencia TTCAAGAGA que funciona para generar el bucle que da lugar al shRNA.

2. Restricción enzimática con BamHI y EcoRI

En la imagen se observan en el pozo 1 el marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder, en el segundo pozo se corrió una dilución 1:10 del plásmido sin digerir para tenerlo como referencia antes del corte enzimático, en el pozo 3 se aprecian bandas en 6.4 kb que corresponden al plásmido, y una banda en 1 kb, que corresponde con el peso del gen YY2 que se liberó para la obtención del plásmido linealizado.

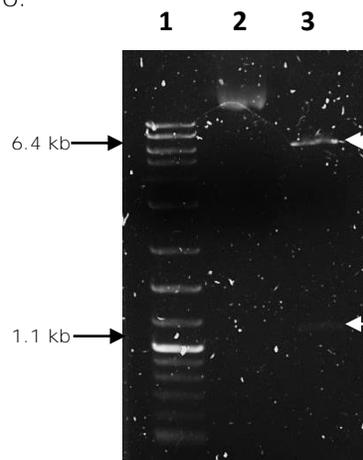


Figura 7: Restricción enzimática con BamHI y EcoRI. En el carril 3 se observan dos bandas, la primera banda en 6.4 kb corresponde al plásmido pSIREN retroQ linal y la segunda banda que aparece en 1kb, corresponde al gen YY2.

3. Clonación de los vectores

Se empleó el plásmido pSIREN retroQ, al cual se ligó los oligos top y bottom alineados de cada ARNi para obtener 2 vectores (uno para el ARNi1 y otro para el ARNi2).

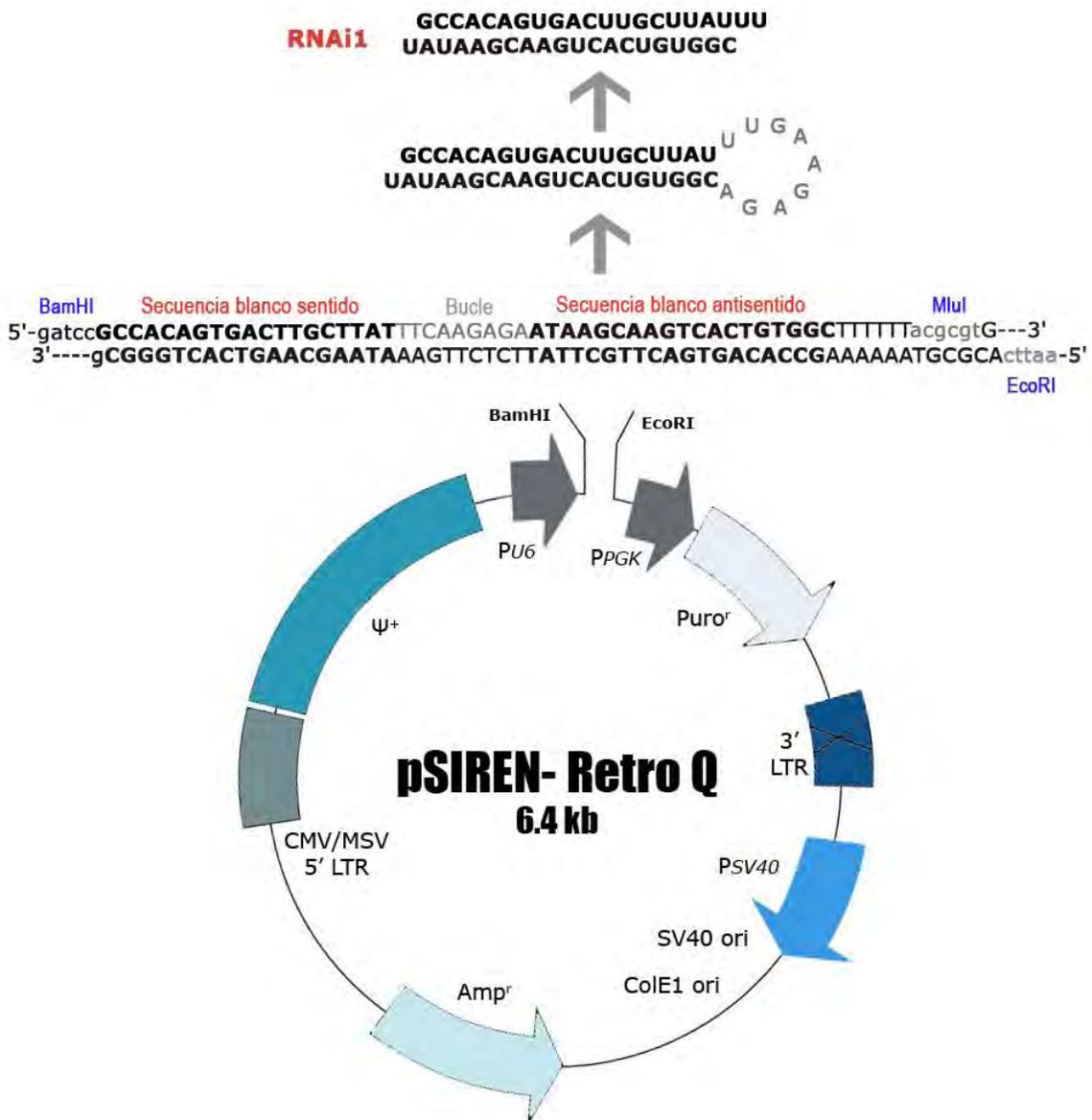


Figura 8: Obtención del vector con el ARNi1. Se muestra el mapa del vector, así como los sitios de restricción de las enzimas BamHI y EcoRI, donde se inserta el oligo de doble cadena previamente alineado. Posteriormente se genera el shRNA por apareamiento de bases y el bucle formado es escindido por Dicer una vez que es procesado por la célula. Modificado de Clontech Laboratories <http://www.yrgene.com/documents/vector/utf-8zh-cnpt3737-5.pdf>

4. Digestión con MluI

Después de la transformación de las bacterias *Escherichia coli* DH5a competentes se corrobora la presencia del ARNi en cada vector. Para ello, en el diseño del ARNi se adicionó la secuencia ACGCG que es reconocida por la enzima MluI. A partir de las colonias aisladas y cultivadas en agar LB con ampicilina 100µg/µL, se seleccionaron las que presentaron mayor crecimiento bacteriano y se realizó la extracción de ADN para finalmente correr un gel de agarosa al 2% que muestra el corte de la enzima.

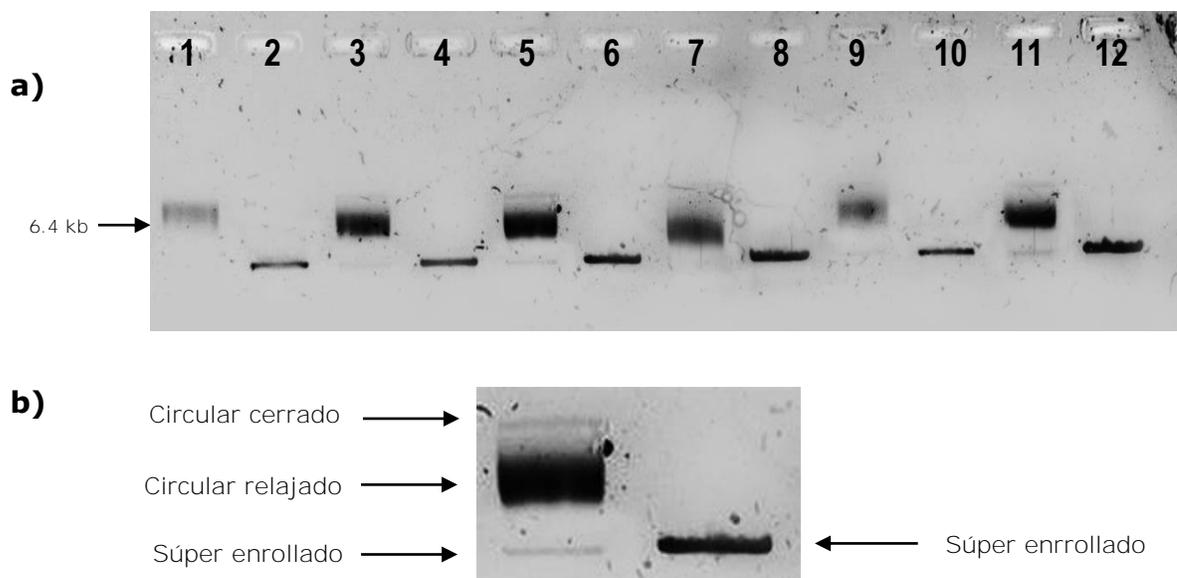


Figura 9: Gel de agarosa al 1% con restricción enzimática con MluI. a) En los carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se encuentra el ADN plasmídico sin restricción. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se corrió el ADN plasmídico después de la restricción con MluI de 4 colonias transformadas con el ARNi 1. En los carriles 10 y 11, se observan bandas después de la restricción con MluI en 2 colonias transformadas con el ARNi2. Se emplearon las colonias de los carriles 9 y 13 para realizar la transformación con células HeLa ya que su relación 260/280 y la concentración de ADN fue la mejor. b) Ampliación del pozo 6 y 7 donde se observan 3 de las formas de plásmido sin digestión y al ser cortados por MluI, se observa la forma súper enrollada.

5. Estandarización de cIAP2

Para determinar las condiciones óptimas para la amplificación de cIAP2, se realizó una curva a diferente número de ciclos con un volumen determinado de ADN complementario del control, en donde el producto de interés que presentó una banda nítida y sin saturación se seleccionó para determinar la expresión del ARN mensajero de cIAP2.



Figura 10: Estandarización de cIAP2. La imagen muestra las bandas obtenidas a 30, 35 y 40 ciclos. Se eligieron las condiciones a 35 ciclos por presentar una banda nítida pero no saturada, a diferencia de la banda observada a 30 ciclos que no se aprecia claramente, o la de 40 ciclos que se observa saturada.

6. Expresión de ARN mensajero de cIAP2

Posterior a la transfección de células HeLa con los ARN de interferencia y el control, se realizó la extracción de ARN total para obtener ADN complementario, empleado para realizar la PCR de TBP y cIAP2. TBP se normalizó y con ello se establecieron las condiciones para realizar la PCR de cIAP2. Los productos de PCR de TBP tienen un peso de 119 pb, mientras que los de cIAP2 de 351 pb.

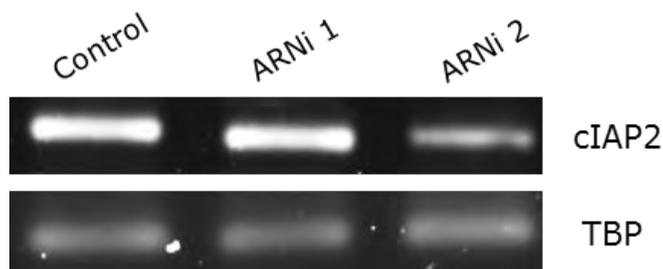


Figura 11: Expresión del ARNm de cIAP2. El carril 2 muestra que a nivel de ARNm no se obtuvo una disminución por efecto del ARNi1 comparada contra el control y en el caso del ARNi2 se aprecia una disminución del ARNm de BIRC3 comparada contra el control. Como gen constitutivo se observa la normalización de TBP.

7. Western blot

Se realizó un Western blot para determinar la expresión de la proteína cIAP2 en las células control y las transfectadas con el ARNi1 y el ARNi2. La normalización se realizó a partir del gel de acrilamida al 12%.

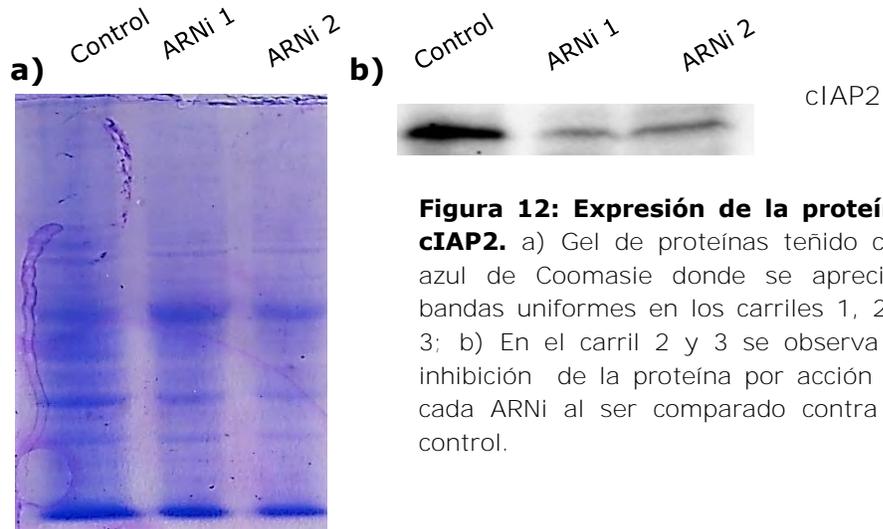
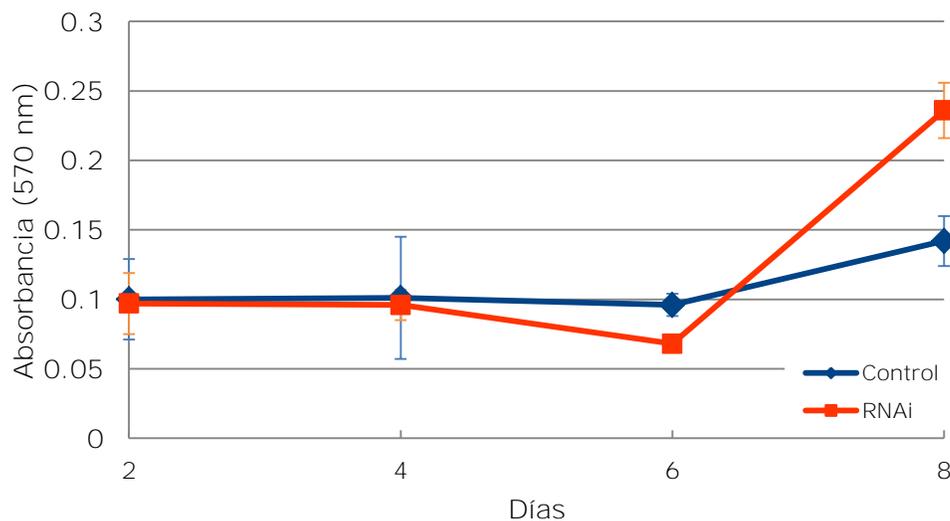


Figura 12: Expresión de la proteína cIAP2. a) Gel de proteínas teñido con azul de Coomassie donde se aprecian bandas uniformes en los carriles 1, 2 y 3; b) En el carril 2 y 3 se observa la inhibición de la proteína por acción de cada ARNi al ser comparado contra el control.

8. Proliferación

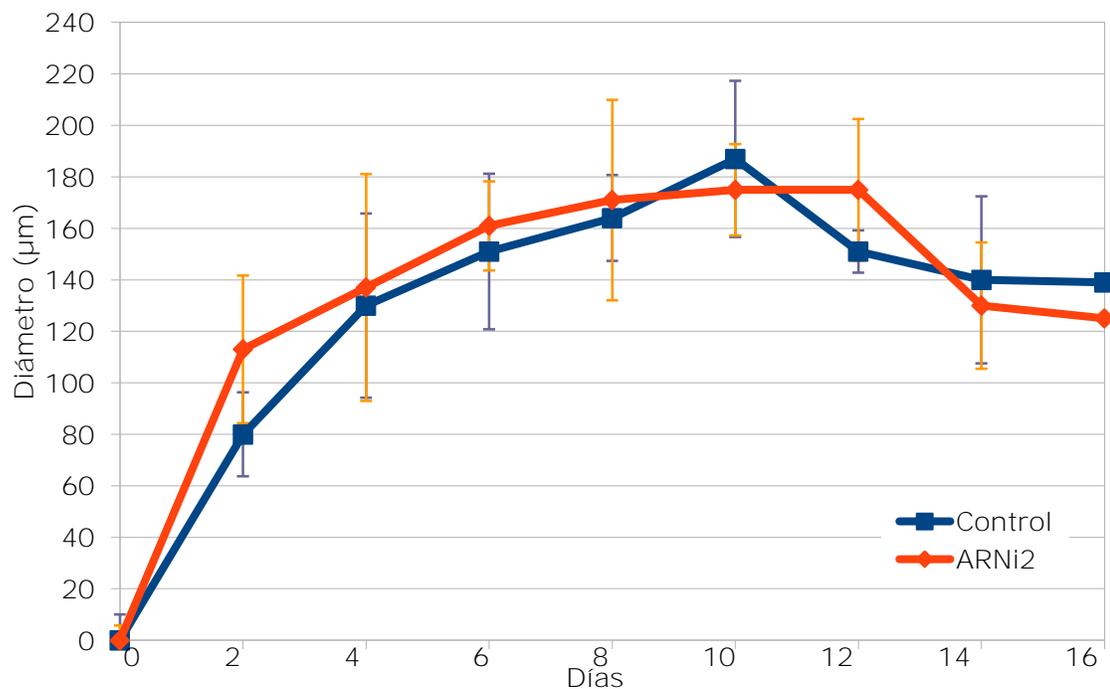
Se realizó una gráfica para observar la proliferación entre células control y las células transfectadas con el ARNi2.



Gráfica 1: Proliferación de HeLa control y HeLa ARNi2. En la gráfica se observan las barras de desviación estándar para cada muestra.

9. Esferoides

Se midieron los diámetros de los esferoides con micrómetro ocular, se tomaron fotografías representativas de diferentes días y se determinó el promedio de tamaño a partir del conteo de 10 esferoides tanto control como ARNi2, el experimento se siguió durante 16 días.



Gráfica 2: Curva de crecimiento de esferoides HeLa control y HeLa ARNi2. En la gráfica se observan las barras de desviación estándar para cada muestra.

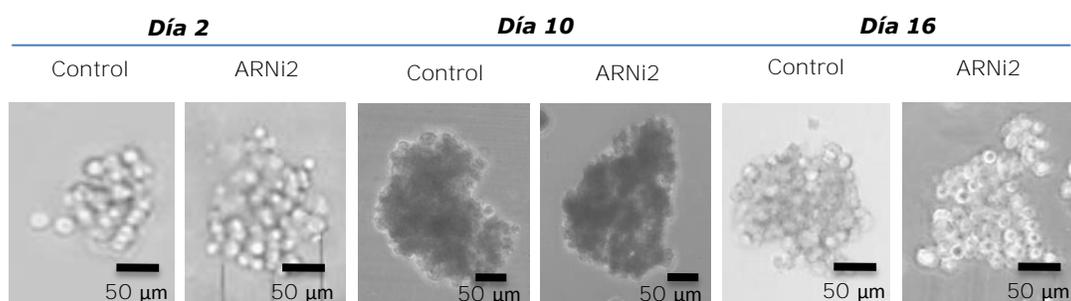


Figura 13: Fotografías de esferoides a los días 2, 10 y 16 de crecimiento. Se muestran los cambios morfológicos de los esferoides control comparados con los transfectados con el ARNi2 en diferentes días de crecimiento. La barra de cada fotografía al lado inferior derecho corresponde a una escala de 50 µm.

IX. Discusión

La proteína cIAP2 tiene diferentes funciones entre las que se encuentran modulación de la inflamación e inmunidad, proliferación celular, señalización de cinasas mitogénicas, invasión celular, metástasis y apoptosis. La función de apoptosis ha sido ampliamente estudiada por la participación que ejerce en la vía extrínseca (PhosphoSitePlus, 2017). Los dominios de la proteína han sido estudiados para determinar su función, y se encontró que el dominio RING puede funcionar de manera dependientes de los dominios CARD y BIRC, promoviendo la ubiquitinación de caspasa 7 y caspasa 3 (Huang, H. y col. 2000). Estudios posteriores revelaron que posee actividad de E3 ubiquitin ligasa gracias a su dominio RING, esta característica le permite participar en la regulación de la vía NF- κ B (Budhidarmo, R. y Day, C. 2014).

El uso de ARNi para la disminución de la expresión del ARNm y proteínas es un modelo que por la facilidad de uso y rapidez, permitió realizar pruebas que serán de utilidad para el estudio de cIAP2. La relevancia de este proyecto es brindar una herramienta que será empleada para evaluar el efecto protector a apoptosis conferido por DEX en cáncer cervicouterino, donde se cree que esta proteína juega un papel importante. Para ello se diseñaron 2 ARNi de tipo shRNA, ya que se ha demostrado que en promedio, solo 1 de cada 5 shRNA/siRNA funciona efectivamente contra el gen blanco y que se deben dirigir a regiones diferentes de la secuencia blanco (Kumar, R y col. 2003; Mocellin, S. y Provenzano, M. 2004). De ahí la importancia de probar al menos 2 de ellos para tener más posibilidades de realizar un knock-down efectivo.

Para construir los vectores, se linealizó el plásmido con el corte de las enzimas BamHI y EcoRI (Figura 7), ambas enzimas producen extremos cohesivos que dejan libre una sola cadena de ADN para que posteriormente la enzima ligasa una los extremos generados del plásmido pSIREN retroQ linear con cada uno de los ARNi (ARNi1 y ARNi2), obteniendo dos vectores (Figura 8).

Posterior a la construcción de los vectores se transformaron células *Escherichia coli* DH5a competentes con éstos y se aislaron colonias diferentes para cada

ARNi, de las que se obtuvo ADN empleado para verificar que el proceso de ligación de los vectores se haya efectuado correctamente mediante una restricción con la enzima MluI (Figura 9), sin embargo no se observó la forma lineal una vez realizada la restricción por la ineficiencia de la enzima, por ello se realizó directamente la técnica de PCR en la cual previamente, de las colonias obtenidas, se seleccionó la colonia representativa de cada ARNi, se realizó la amplificación de cada una de ellas y se purificó el ADN, que fue usado para transfectar en células HeLa.

Para determinar el efecto de cada ARNi se empleó la técnica de PCR con primers dirigidos hacia el ARNm de BIRC3. Para determinar las condiciones óptimas para la amplificación de cIAP2, se realizó una estandarización del proceso (Figura 10). Al realizar la PCR y cotejar el control contra los dos ARNi (Figura 11), se obtuvo una inhibición únicamente por el ARNi2, donde se aprecia una banda menos saturada comparada con el control, lo que indica la degradación del mensajero por lo tanto efectividad del ARNi. Por otro lado, el ARNi1 no degradó el mensajero, y la banda se observa similar al control. Ambos shRNA se encuentran **dirigidos a la región 3'UTR del gen, que previamente se ha reportado** (Lai, CF. y col. 2013) permite el efecto de represión ejercido por el siRNA al igual que si se dirigiera a la región codificante. El motivo por el que se atribuye una efectividad diferente de cada siRNA es la estabilidad termodinámica de la estructura secundaria tanto de la secuencia blanco como del siRNA. Con el fin de establecer esta relación en el proyecto, se necesita de un análisis con herramientas bioinformáticas que permitan conocer la interacción de cada shRNA con su respectiva secuencia blanco.

Para determinar si existe una inhibición de la proteína cIAP2, se realizó la extracción proteica de las células tanto el control, como las transfectadas con el ARNi2 y el ARNi2, y se realizó un Western blot con el anticuerpo específico a la proteína cIAP2. La Figura 12 muestra disminución en la expresión de la proteína cIAP2 comparadas con el control sin embargo es necesario realizar la normalización con el gen **constitutivo β -tubulina** para determinar si se realizó un knock-down efectivo con ambos siRNA.

Con el fin de conocer el efecto del ARNi2, que fue el que mostró efectividad en el knock-down del ARNm, se realizó un ensayo de proliferación (Gráfica 1) donde la

tendencia que presenta el control y las células transfectadas con el ARNi es similar y no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos al aplicar la prueba estadística de Mann-Whitney. También se observan las barras de desviación estándar, que permiten determinar que la dispersión de los datos es baja por lo que el comportamiento del experimento en sus repeticiones es similar. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Jin, H. y Lee, T. en 2006, que evalúa la participación de cIAP2 en el ciclo celular y muestra que en células HeLa control y tratadas con un siRNA dirigido a cIAP2, no existe diferencia significativa en la proliferación celular entre los tratamientos y el siRNA por sí solo, no afecta el progreso normal del ciclo celular.

Por otro lado, los resultados obtenidos en esferoides indican un comportamiento similar entre el control y las células transfectadas con el ARNi2, como se observa en la gráfica 2, donde tampoco se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) al analizarlos estadísticamente con la prueba de Mann-Whitney. Las desviaciones estándar son elevadas debido a la técnica, ya que las células no poseen una distribución homogénea y controlada en el medio, por lo tanto el contacto entre ellas es variable lo que permite que formen esferoides de diversos tamaños y formas. La ventaja del método radica en la facilidad para llevarlo a cabo y el costo es más bajo que el uso de materiales y equipo especializados (Yuhas, J. y col., 1977; Hamilton, G. y col., 2001; Lin, RZ. y Chang, HY. 2008). El tamaño de los esferoides en células HeLa control reportados por Baek, N. en 2016 es de alrededor de 157 μm al día 3 de crecimiento; sin embargo, la variación en el tamaño (Figura 12) puede deberse al tipo de método usado para el crecimiento de esferoides. Además no se han registrado reportes del tamaño de esferoides en células HeLa empleando ARNi contra BIRC3.

De acuerdo al mecanismo de cIAP2, se esperaría tener un alto índice de apoptosis ya que la inhibición de cIAP2 permite que RIP1 forme un complejo con FADD, activando a caspasa 8 y generando apoptosis. Previamente se han realizado knock-down de cIAP2 y en un estudio se demostró que en líneas celulares de mieloma múltiple la inhibición de cIAP1, cIAP2 y XIAP es necesaria para la inducción a apoptosis (Ramakrishnan, V. y col., 2012). También se ha probado la efectividad de los siRNA de cIAP2 en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata, donde se logra una disminución de la proteína y el ARNm comparado

con el control, pero cuando se realiza un pool de cIAP2, cIAP1 y XIAP, se logra una efectividad mayor del knock-down. Este estudio concuerda con los resultados experimentales del ensayo de proliferación, en donde el efecto de un siRNA, por sí mismo, no es capaz de generar cambios en la proliferación celular. Como parte del estudio previamente mencionado también se midió la apoptosis basal empleando el pool de siRNAs y no hubo un incremento en esta, lo anterior, comparado con los resultados obtenidos, sugiere que es necesario realizar pruebas con diferentes concentraciones de los ARNi y emplear otros métodos de silenciamiento (Gill, C. y col. 2009).

En este proyecto sería necesario realizar un ensayo para medir caspasa 8 o anexina V para comprobar el efecto apoptótico real que produce cada ARNi en las células HeLa.

X. Conclusiones

- Se diseñaron 2 ARNi contra el gen BIRC3 que permitieron la construcción de vectores para cada ARNi diseñado.
- Se analizó la expresión a nivel de ARNm de cada ARNi en el que solo uno de ellos fue efectivo.
- Se analizó la expresión de la proteína cIAP2 para determinar el efecto de cada ARNi pero no se obtuvieron resultados concluyentes.
- Se analizó la proliferación celular para el ARNi2 y el control y no se encontró diferencia significativa entre ambos.
- Se analizó el crecimiento de esferoides con el ARNi2 y el control y no se encontró diferencia significativa entre ambos.

XI. Perspectivas

- Realizar la normalización de la técnica de **Western blot con el gen constitutivo β -tubulina** para determinar si se realiza un knock-down efectivo a nivel de proteína por ambos ARNi.
- Realizar ensayos de apoptosis para conocer el efecto real ejercido por el ARNi2.
- Realizar ensayos de proliferación y crecimiento de esferoides con el ARNi1 para determinar su comportamiento.
- Emplear los ARNi para el estudio del efecto protector a células de cáncer cervicouterino conferido por DEX cuando se induce apoptosis por CP y determinar el papel que juega la proteína cIAP2 en esta vía.

XII. Bibliografía

1. Baek, N., Seo, O., Kim, M., Hulme, J. y Soo A An, S. (2016) Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. *Onco Targets Ther*; 9: 7207-7218.
2. Bartholomeusz, G. y Rao, A. (2014) A Three-Dimensional Spheroid Cell Culture Model for Robust High-Throughput RNA Interference Screens. *Frontiers in RNAi*; 1: 215-231.
3. Bertrand, M., Milutinovic, S., Dickson, K., Chi, W., Bourdreault, A., Durkin, J., Gillard, J., Jaquith, J., Morris, S. y Barker, P. (2008) cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination. *Molecular Cell*; 30: 689-700.
4. Budhidarmo, R. y Day, C. (2014) The ubiquitin-associated domain of cellular inhibitor of apoptosis proteins facilitates ubiquitylation. *J. Biol. Chem*; 289(37): 25721-25736.
5. Cascales, M. (2003) Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm*; 69: 36-64.
6. Clontech Laboratories. RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector Information [En línea] Disponible en: <http://www.yrgene.com/documents/vector/utf-8zh-cnpt3737-5.pdf> [Recuperado el 20 de mayo de 2017]
7. De Almagro, D. (2012) The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*; 34 (3): 200-211.
8. Dürkop, H., Hirsch, B., Hahn, C. y Stein, H. (2006) cIAP2 is highly expressed in Hodgkin-Reed-Sternberg cells and inhibits apoptosis by interfering with constitutively active caspase-3. *J Mol Med*; 84: 132-141.
9. Edmonson, R., Jenkins, J., Adcock, A. y Yang, L. (2014) Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*; 12 : 207-218.
10. Elbashir SM., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. y Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*; 24,411(6836): 494-498.
11. Elmore, S. (2007) Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *Toxic Pathol*; 35(4): 495-516.

12. Espinosa, M. Cantú, D., Herrera, N., López, CM., De la Garza, JG., Maldonado, V. y Meléndez-Zajgla, J. (2006) Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer. *BMC Cancer*; 6(45).
13. Fire, A., Xu, S., Montgomery, MK., Kostas, SA., Driver, SE. y Mello, CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391:806-810.
14. Flusberg, D. y Sorger, P. (2015) Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol*; 25(8): 446-458.
15. Gassler, N., Zhang, C., Wegner, T., Schnabel, P., Dienemann, H., Debatin, K., Mattern, J. y Herr, I. (2005) Dexamethasone-induced cisplatin and gemcitabine resistance in lung carcinoma samples treated ex vivo. *British Journal of Cancer*; 92,1084-1088.
16. Gill, C., Dowling, C., O'Neill, A. y Watson, W. (2009) Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Mol Cancer*; 8(39).
17. Hanahan, D. y Weinberg, R. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*; 144: 646-674.
18. Hamilton, G., Westmorel, C. y George, A. E. (2001) Effects of medium composition on the morphology and function of rat hepatocytes cultured as spheroids and monolayers. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*; 37; 656-667.
19. Hansen, M. y Meier, P. (2010) IAPS: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nature Reviews*; 10: 561-574.
20. Hotchkiss, R. y Nicholson, D. (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature Reviews Immunology*; 6: 813-822.
21. Hou, W., Guan, J., Lu, H., Dong, Q., Han, Y. y Zhang, R. (2014) The effects of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells induced by paclitaxel. *Journal of Ovarian Research*; 7(89).
22. Huang, H., Joazeiro, C., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J. y Hunter, T. (2000) The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspase 3 and 7. *J. Biol. Chem*; 275: 26661-26664.
23. IARC, (2016) GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [En línea] Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx [Recuperado el 19 Enero de 2016]
24. Indran, I., Tufo, G., Pervaiz, S. y Brenner, C. (2011) Recent advances in apoptosis, mitochondrial and drug resistance in cancer. *Biochim biophys acta*; 1807: 735-745.

25. Ivanov, D. y Grabowska, A. (2017) Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. *Sci Rep*; 7(41160).
26. Jin, H. y Lee, T. (2006) Cell cycle-dependent expression of cIAP2 at G2/M phase contributes to survival during mitotic cell cycle arrest. *Biochem J*; 399: 335-342.
27. Jordán, J. (2003) Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*; 22(6): 100-106.
28. Kumar, R., Conklin, D. y Mittal, V. (2003) High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing. *Genome Res*; 13(10): 2333-2340.
29. Lai, CF., Chen, CY. Y Au, LO. (2013) Comparison between the repression potency of siRNA targeting the coding región and the 3'-Untranslated región of mRNA. *Biomed Res Int*; 2013(637850).
30. Lin, RZ. y Chang, HY. (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J*; 3: 1172-1184.
31. Mathijs, B. y Marynen, P. BIRC3 baculoviral IAP repeat-containing 3. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. September 2001 [Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2016] Disponible desde <http://atlasonline.critt-informatique.fr/Genes/BIRC3ID239.html>
32. Meister, G. (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature*; 14: 447-459.
33. Mocellin, S. y Provenzano, M. (2004) RNA interference: leng gene knock-down from cell physiology. *Journal of Translational Medicine*; 2(39).
34. OMIM, 601721. Baculoviral IAP Repeat-containing protein 3; BIRC3. [Fecha de consulta: 8 de noviembre de 2016] Disponible desde <http://omim.org/entry/601721>
35. Ortiz, E. (2009). Efecto protector de la dexametasona en la apoptosis inducida por el cisplatino. El papel de Noxa, PUMA y Snail (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
36. Pfam 31.0 EMBL-EBI, CARD, UBA y RING [en línea] Pfam database [fecha de consulta: 9 de mayo de 2017] Disponible desde <http://pfam.xfam.org/>
37. PhosphoSitePlus. Cell Signaling Technology. cIAP2 (human) PhosphoSitePlus database [fecha de consulta: 15 de mayo de 2017] Disponible desde <http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=10067&showAllSites=true>
38. Ramakrishnan, V., Kimlinger, T., Painuly, U., Haug., Rajkumar, V. y Kumar, S. (2012) Simultaneous inhibition of cIAP1, cIAP2 and XIAP is required for inducing apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood*; 120(2943).

39. Runnebaum, I. y Brüning, A. (2005) Glucocorticoid inhibits cell death in ovarian cancer and up-regulate caspase inhibitor cIAP2. *Clin Cancer Res*; 11(17): 6325-6332.
40. Uniprot Consortium, BIRC3_HUMAN [en línea] UniProtKB Protein Knowledgebase [Fecha de consulta: 23 de octubre de 2016] Disponible desde <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13489>
41. Weinberg, R. 2013. *Biology of Cancer*. Second Edition. USA: Garland Science. 31-32.
42. WHO, (2016) Cancer [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/> [Recuperado el 14 de enero de 2016]
43. Winter, E., Domenghini, L., Silva, A., Nunes, R., Yunes, R. y Creczynski-Pasa, T. (2014) Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. *Toxicol in vitro*; 28(5): 769-777.
44. Yang, Y., Fang, S., Jensen, J., Weissman, A. y Ashwell, J. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*; 288: 874-877.
45. Yuhas, J., Li, A., Martinez, A. y Ladman, A. (1977) A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*; 37: 3639-3643.