



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA HNRNP H1 EN LA EXPRESIÓN  
DE LA SURVIVINA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**AMEYALLI SAMANTHA MORENO FERNÁNDEZ**



**CIUDAD DE MÉXICO, 10 de Junio 2018**



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.



**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Profesor:</b>	<b>SOBEIDA SANCHEZ NIETO</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Profesor:</b>	<b>ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Profesor:</b>	<b>JORGE MELENDEZ ZAJGLA</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor:</b>	<b>FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA</b>
<b>2º SUPLENTE:</b>	<b>Profesor:</b>	<b>ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. JORGE MELENDEZ ZAJGLA \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. FRANCISCO JAVIER GAYTAN CERVANTES \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

AMEYALLI SAMANTHA MORENO FERNÁNDEZ \_\_\_\_\_



## Índice

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>4</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>5</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>Marco teórico</b> .....	<b>8</b>
Cáncer .....	8
Marcas distintivas del cáncer ( <i>Hallmarks of Cancer</i> ).....	10
Apoptosis.....	16
IAPs .....	18
Survivina.....	24
Funciones de la survivina .....	26
hnRNPs .....	30
hnRNP H1 .....	34
<b>Antecedentes experimentales</b> .....	<b>36</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>39</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>40</b>
General:.....	40
Específicos: .....	40
<b>Material y Método</b> .....	<b>41</b>
Cultivo celular .....	41
Trasfección.....	41
Líneas estables HeLa y MCF-7 .....	42
Extracción de ARN y proteína .....	43
Retrotranscripción y reacción de la cadena de la polimerasa .....	45
Inmunoréplica tipo Western Blot.....	48
Formación de Esferoides.....	50
LDA (Limiting dilution analysis).....	50
Tinción con Cristal Violeta .....	51
<b>Resultados y Discusión</b> .....	<b>52</b>
<b>Apartado 1-</b> . Determinación del efecto de la inhibición de hnRNP H1, en la expresión de ARN mensajero de la Survivina, así como de las isoformas DEX3 y 2B. ....	52
<b>Apartado 2-</b> . Determinación del efecto de inhibición de hnRNP H1, en la expresión a nivel de proteína de: Survivina, survivina DEX3 y survivina 2B; en la línea celular HeLa. ....	57
<b>Apartado 3-</b> . Evaluación del efecto de inhibición de la proteína hnRNP H1 sobre el crecimiento celular en la línea HeLa, mediante el ensayo LDA. ....	65
<b>Apartado 5-</b> . Evaluación del efecto de la inhibición de la proteína hnRNP H1 en la formación de esferoides en la línea celular MCF-7. ....	68
<b>Conclusiones</b> .....	<b>72</b>
<b>Expectativas</b> .....	<b>73</b>



<b>Referencias .....</b>	<b>74</b>
--------------------------	-----------

## Índice de Figuras

Figura1-Vía extrínseca y vía intrínseca del proceso de apoptosis.	17
Figura2-Miembros y dominios presentes en las proteínas IAPs	19
Figura 3- Isoformas de Survivina	25
Figura 4-Complejo pasajero cromosomal “CPC”	27
Figura 5-Miembros de la familia de proteínas hnRNPs	30
Figura 6-Procesos en los que participan las hnRNPs	32
Figura 7-Representación del grupo de proteínas hnRNP F/H	35
Figura 8-Evaluación de la expresión de la survivina y survivina DEx3 en la línea celular HeLa	37
Figura 9- Formación de fases, extracción con trizol	44
Figura 10-Efecto de la Inhibición del ARN mensajero de hnRNP H1 en la expresión de Survivina Endógena en la línea celular HeLa	52
Figura 11-Inhibición del ARN mensajero de hnRNP H1 y el efecto en la expresión de las isoformas	54
Figura 12-Estandarización y cuantificación de la expresión de la survivina en células HeLa y MCF-7	55
Figura 13-Efecto de la inhibición de hnRNP H1 en la expresión de proteína	57
Figura 14-Efecto de la inhibición de hnRNP H1 en la expresión de las proteínas: survivina 2B, Survivina DEX3B y Xiap	59
Figura 15-Crecimiento Celular en la línea HeLa	63
Figura 16-Proliferación Celular en la línea celular MCF-7	64



Figura 17-Análisis de la dilución límite	66
Figura 18-Formación de Esferoides en la línea celular MCF-7	69

## Índice de tablas

• Tabla 1- Mezcla de reacción con sondas TAQMAN	47
• Tabla 2- Anticuerpos	48
• Tabla 3- Gel poliacrilamida, transferencia en cámara húmeda	49
• Tabla 4- preparación de buffers, transferencia en cámara húmeda	49



## Resumen

El cáncer es un padecimiento sumamente complejo que actualmente afecta a la población mundial, razón por la cual su estudio ha adquirido gran importancia en la última década. Esta enfermedad, puede afectar cualquier parte del organismo, además de ser un padecimiento muy diverso debido a que un mismo tipo de cáncer posee características únicas entre individuos, a pesar de desarrollarse en el mismo órgano. Una de las características que se ha observado presentan las células cancerígenas es la inhibición del proceso de apoptosis, la cual contribuye al desarrollo tumoral. La importancia de la apoptosis radica en que es el principal mecanismo de muerte celular, que ayuda al mantenimiento de la homeostasis celular.

La apoptosis es mediada por diversas familias de proteínas, un ejemplo es la familia de las proteínas IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis, por sus siglas en inglés "*Inhibitor of Apoptosis Proteins*"). Dentro de esta familia se encuentra la survivina; quien además de participar en la inhibición de la apoptosis, tiene un papel importante en el ciclo celular. La survivina se expresa en diversos tipos de cáncer, y su elevada expresión se asocia a un mal pronóstico para el paciente, además algunos estudios la relacionan con la resistencia a las principales terapias que existen actualmente contra el cáncer. Por lo cual, conocer y entender los mecanismos involucrados en la regulación de la survivina, han adquirido suma importancia en el estudio y la búsqueda de nuevas terapias contra este padecimiento.

Experimentos previos realizados en el laboratorio, sugieren la posible participación de la proteína hnRNP H1 en la regulación de la expresión de la survivina. Se tiene



muy poca información acerca de los procesos en los cuales interviene la proteína hnRNP H1, a pesar de ser miembro del grupo de proteínas hnRNPs que participan de manera importante en múltiples aspectos del metabolismo de los ácidos nucleicos como la maduración y estabilidad del ARN mensajero. Pero la información aún es muy limitada, por lo cual, los experimentos encaminados a esclarecer su función aportarían información valiosa para su entendimiento en el proceso apoptótico.

El presente trabajo tuvo como finalidad establecer la participación de hnRNP H1 en la regulación de la expresión de survivina, mediante la inhibición de hnRNP H1 utilizando un ARN de interferencia (ARNi). Y los resultados obtenidos sugieren que hnRNP H1 participa en la regulación a nivel de proteína de survivina mediante mecanismos independientes a la regulación a nivel de ARN mensajero, afectando la proliferación celular en la línea HeLa y la formación de esferoides en la línea MCF-7, mediante mecanismos que deberán determinarse en trabajos posteriores.





## Marco teórico

### Cáncer

El cáncer es un término que hace referencia a un conjunto de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo, se caracteriza principalmente por un crecimiento anormal de células, lo que repercute de manera directa en la homeostasis celular del organismo (*Hanahan y Weinberg, 2000*).

El cáncer representa un problema de salud a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud en el año 2012 se diagnosticaron 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes en todo el mundo (*Globocan, 2012*), lo que la coloca como la segunda causa de muerte en el mundo. Los tipos de cáncer que se presentan con mayor frecuencia a nivel mundial son: el de pulmón en hombres y el de mama en mujeres; siendo estos dos también la principal causa de muerte en ambos géneros. En cuanto a México el Instituto Nacional de Estadística y Geografía “INEGI” reportó en 2014 que el cáncer es la tercera causa de muerte, siendo los de mayor incidencia en el país: el cáncer de mama en mujeres, el cáncer de próstata y cáncer gástrico en hombres (*INEGI, 2014*).

Las posibles causas por las que se desencadena este padecimiento son muy variadas, de manera general se pueden clasificar en dos grandes grupos: los factores externos y los factores internos. Los factores externos dependen de una alta exposición a: agentes químicos, agentes radiactivos, algunos alimentos,



exposición a contaminantes, así como algunos hábitos como el tabaquismo, entre otros (*Preston y Malcom, 1990*). En cuanto a los factores internos, estos se observan en alteraciones en el genoma como son: mutaciones, translocaciones, deleciones, inversiones, cambios epigenéticos, etc. (*Vogelstein y Papadopoulos, 2013*). Ambos factores, tanto externos como internos pueden ejercer su acción en conjunto o en secuencia para iniciar o promover el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, el proceso por el cual una célula normal se transforma en una célula tumoral es sumamente complejo y variado, de hecho, un mismo tipo de cáncer a pesar de desarrollarse en el mismo órgano es diferente en cada individuo, tanto en la generación del tumor así como también a nivel genético, lo que dificulta en gran medida el diagnóstico y el tratamiento para los pacientes (*Vogelstein y Papadopoulos, 2013*); convirtiendo el cáncer en una patología sumamente compleja. Sin embargo, pese a las diferencias antes mencionadas, numerosos estudios facilitaron la elaboración de un compendio con las principales características que poseen las células tumorales; éstas características se conocen como “*Hallmarks of Cáncer*” o marcas distintivas del cáncer.



## Marcas distintivas del cáncer (*Hallmarks of Cancer*)

Las marcas del cáncer, los cuales nombraremos Hallmarks de aquí en adelante, son características que presentan las células tumorales y se describieron por primera vez en el año 2000 por *Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg*. Colocando una lista con seis características, cifra que aumentaría a diez Hallmarks en el año 2011.

Los *Hallmarks* son un grupo de alteraciones cuya aparición varía de un tumor a otro y que, además, puede presentarse en uno o varios de ellos a lo largo de las diferentes etapas del proceso carcinogénico, esto depende en gran parte del ambiente tumoral en el cual se origine la neoplasia y varían entre los tumores del mismo tipo y entre los que no lo son (*Hanahan y Weinberg, 2011*). Los Hallmarks se mencionan a continuación:

**Señales de proliferación sostenida:** este es el rasgo más característico de las células cancerígenas, como se mencionó anteriormente las células se encuentran en un constante equilibrio de proliferación y muerte, asegurando así la homeostasis celular. Así pues, para que las células normales pasen a un estado de proliferación controlado es necesario que reciban señales de crecimiento por medio de la unión de diferentes ligandos a sus respectivos receptores transmembranales, mientras que las células cancerosas son capaces de producir factores de crecimiento sin ningún estímulo previo, lo que resulta en la estimulación autocrina proliferativa (*Hanahan y Weinberg, 2000*); entre los factores involucrados en dicho proceso se encuentran componentes de matriz extracelular y moléculas de adhesión, por mencionar algunos.



***Insensibilidad ante las señales de paro de proliferación:*** dentro del funcionamiento normal de las células se encuentran los mecanismos antiproliferativos, que constan de inhibidores de crecimiento solubles dentro de la matriz extracelular. Las células cancerosas son capaces de evadir dichos mecanismos, por ejemplo, se ha reportado que cuando el gen Rb se encuentra mutado, la célula permite el paso de la fase G1 a S, así como la desactivación de integrinas y otras moléculas de adhesión encargadas de mandar señales de paro (*Hanahan y Weinberg, 2011*).

***Evasión de la apoptosis:*** esta es una de las características principales de las células cancerosas, ya que la evasión a este mecanismo es fundamental para que las células continúen proliferando descontroladamente. Algunas de las causas del mal funcionamiento del mecanismo de apoptosis se deben a la pérdida de función de algún factor *pro-apoptótico*, por ejemplo: mutaciones en el gen supresor de tumor *p53* el cual, se encarga de detectar daños en el ADN y es capaz de parar la proliferación celular o también por la inhibición de algún miembro de la cascada de las caspasas, tema que se discutirá ampliamente más adelante (*Hanahan y Weinberg, 2011*).



**Potencial replicativo ilimitado:** dentro de los sistemas de regulación de proliferación con los que cuentan las células normales, e independiente a los mencionados con anterioridad, se encuentra la cantidad de eventos de replicación que pueden llevar a cabo las células. Este mecanismo se origina a partir del acortamiento de los telómeros, ubicados en los extremos de los cromosomas, cuya función consiste en proteger la integridad del ADN, además de resolver el problema del término de la replicación (*Xu y Shang, 2013*). Así pues, todas las células cuentan con un número limitado de replications y cuando este se cumple dejan de dividirse y pasan a un estado denominado de senescencia. En diferentes estudios se ha observado que las células cancerosas pueden evadir este mecanismo de regulación mediante la extensión de los telómeros, ya que son capaces de sobre expresar la enzima telomerasa; la cual únicamente se encuentra activa en: células madre, células progenitoras humanas y células germinales; la mayoría de las células somáticas carecen o presentan niveles bajos de telomerasa, por lo que está sobre expresión permite a las células cancerosas replicarse ilimitadamente (*Hanahan y Weinberg, 2000, Xu y Shang, 2013*).



**Angiogénesis sostenida:** se refiere a la capacidad de las células cancerígenas de promover la formación de nuevos vasos sanguíneos, con el fin de transportar oxígeno y nutrientes a las zonas más internas del tumor y desechar los residuos del metabolismo resultante. Se ha encontrado que en algunos tumores la sobreexpresión de factores como *VEGF* (factores de crecimiento endotelial) y *FCF* (factores de crecimiento de fibroblastos) son esenciales en la generación de vasos sanguíneos. Por otro lado, también se ha reportado que se presenta una baja expresión de inhibidores angiogénicos como la *trombospondina-1*, mientras que en las células normales se observó lo contrario: baja expresión de factores de crecimiento y alta expresión de *trombospondina-1* (Hanahan y Weinberg, 2000).

**Invasión y metástasis:** la metástasis se refiere a la capacidad de las células tumorales de migrar de su punto de origen a otros órganos, comprometiendo así el funcionamiento de dicho órgano. El proceso metastásico consta de diferentes etapas y necesita de condiciones específicas, algunas favorecidas en gran parte por el microambiente, para generar células capaces de migrar a través del sistema sanguíneo, lo que lo hace un proceso sumamente complejo. Esta capacidad representa una característica mortal; ya que el poder migrar le permite a su vez invadir otros tejidos, lo que dificulta en gran medida el tratamiento, llevando a los pacientes a un mal pronóstico (Hanahan y Weinberg, 2000).



**Desregulación de las vías metabólicas:** como parte del proceso carcinogénico se da un ajuste del metabolismo, para que las células cancerosas obtengan nutrientes, promoviendo así el crecimiento y la división. Se ha demostrado que las células cancerígenas prefieren la obtención de energía por medio de la “*glucolisis aerobia*”, efecto conocido como *Warburg*, el cual propone que las células cancerígenas aun en presencia de oxígeno obtienen energía por medio de la glucólisis, cuyo mecanismo da como resultado solo dos moléculas de ATP, pudiendo obtener 32 por medio de la fosforilación oxidativa en presencia de oxígeno. Las células cancerígenas, a pesar de tener los sustratos para poder obtener un mayor número de moléculas de energía, obtienen un número mucho menor de moléculas de ATP, ya que algunos intermediarios generados en la glucólisis, dan pie a la formación de nucleósidos, aminoácidos entre otras moléculas, los cuales ayudan a su vez a la formación de macromoléculas necesarias para la proliferación celular. Por otro lado, también algunos de estos intermediarios propician un ambiente tumoral idóneo para el crecimiento o desarrollo del tumor (*Hanahan y Weinberg, 2011*).

**Inestabilidad del genoma:** representa el conjunto de alteraciones genéticas que se presentan durante el desarrollo del tumor dentro de las que se encuentran: mutaciones, ganancia de función, deleciones, variación en el número de copias, entre otras; por lo que muchos de los Hallmarks antes mencionados dependen en gran medida de las alteraciones en el genoma de las células neoplásicas (*Hanahan y Weinberg, 2011*).



***Evasión del sistema inmune y Promoción de la inflamación:*** como es de esperar el sistema inmune reacciona ante la presencia de las células cancerosas, por ejemplo: mediante la producción de células NK “*asesinas naturales*” por sus siglas en inglés *Natural Killer*, las cuales son capaces de reconocer y de eliminar las células tumorales (*Hanahan y Weinberg, 2011*). Las células cancerígenas también son capaces de evadir al sistema inmune mediante la desactivación de factores clave, por ejemplo, secretando *TGF-  $\beta$*  u otro factor inmunosupresor capaz de paralizar la infiltración de células CTL (linfocitos T citotóxicos por sus siglas en inglés “*Cytolytic T Lymphocyte*”) y células NK. Por otro lado, las células cancerígenas promueven la inflamación, proceso inmunológico que se activa como respuesta ante una lesión o daño. Ya que este estado propicia un microambiente tumoral adecuado para que las células cancerosas proliferen, aportando diferentes compuestos como son: factores de crecimiento, factores de supervivencia proangiogénicos, especies reactivas de oxígeno (implicadas en la malignidad del tumor), entre otros, promoviendo de esta manera el proceso carcinogénico (*Hanahan y Weinberg, 2011*).





## Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo que se da de manera organizada en respuesta a estímulos extra o intracelulares. Se caracteriza por la respuesta conjunta de cambios específicos, entre los que se encuentra la condensación y fragmentación nuclear, pérdida de adhesión de la matriz extracelular, pérdida de la estructura dinámica de la membrana, degradación de las proteínas del citoesqueleto y finalmente fragmentación del ADN (Ouyang y Shi, 2012).

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular que se activa cuando el daño al ADN es irreparable. Existen dos vías principales de activación de la apoptosis (figura1); la *vía extrínseca* y la *vía intrínseca*. La vía extrínseca conocida también como de receptores de muerte (RecepM), se activa por la unión de sus respectivos ligandos extracelulares (L), a los receptores intramembranales, como lo son el receptor *Fas* y el factor de necrosis tumoral *TNF*, por mencionar algunos. Estos receptores poseen dominios de muerte DD; por sus siglas en inglés *dead domains*, los cuales permiten la formación del complejo “L-RecepM-DD” o en este caso “FADD” (dominio de muerte unido a Fas) como se puede observar en la figura 1, posteriormente este complejo permite que se recluten diferentes compuestos cuyos dominios permiten la activación de las caspasas iniciadoras y efectoras lo que finalmente desencadena la muerte celular. Por su parte la vía intrínseca se activa por agentes externos que generan daño al DNA, como pueden ser la luz ultravioleta, agentes químicos, estrés celular, entre otros. Esta vía se encuentra regulada por enzimas mitocondriales que liberan citocromo C lo que provoca la

activación de la caspasa-9 desencadenando el proceso apoptótico (Ouyang y Shi, 2012).

La alteración de este proceso en cualquiera de sus dos vías, puede llegar a inhibir el proceso de apoptosis lo que les confiere a las células resistencia a estímulos apoptóticos. Un ejemplo, es la alteración de la vía intrínseca de la apoptosis mediante la proteína BCL-2, la cual, es capaz de regular la permeabilidad de la membrana mitocondrial, impidiendo la liberación del citocromo C, evitando de esta manera que se desencadene el proceso apoptótico (Ouyang y Shi, 2012). Otra familia capaz de evitar el proceso de apoptosis son proteínas inhibidoras de la apoptosis IAPs por sus siglas en inglés *protein inhibitors of apoptosis*.

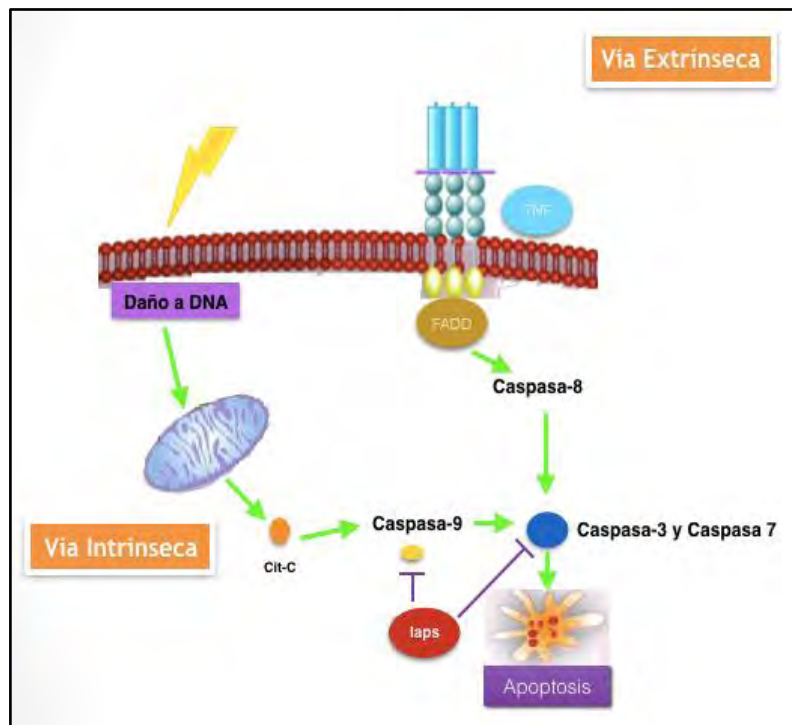


Figura 1-Vía extrínseca y vía intrínseca del proceso de apoptosis.



## IAPs

Las IAPs son una familia de proteínas cuya función principal consiste en la inhibición de la apoptosis, proceso donde se describieron por primera vez. Posteriormente se encontró que estas proteínas también participan regulando otros procesos, tales como: la progresión del ciclo celular, la división celular, diferenciación, procesos de migración, modulación de la señalización inflamatoria y la respuesta inmune, entre otros (*Sharma. 2016*). Se ha descrito que esta familia cuenta con ocho miembros: *NAIP* o BIRC1, *cIAP1* o BIRC2, *cIAP2* o BIRC3, *XIAP* o BIRC4, *Survivina* o BIRC5, *BRUCE* o BIRC6, *ML-IAP* o BIRC7 y *ILP2* o BIRC 8 (*Verhagen y Coulson, 2001, Sharma y Thomas. 2016*).

La estructura y función de las proteínas IAPs es diferente en cada miembro, de manera general; esta familia de proteínas se caracteriza por contar con uno a tres dominios BIR, además varios de sus miembros cuentan con otros dominios como lo son el dominio CARD, RING, UBA, NOD, los cuales le confieren propiedades únicas a cada uno de los miembros (*Budhidarmo y Day, 2014*). En la figura 2 se muestra una lista de los miembros de esta familia; así como su estructura.

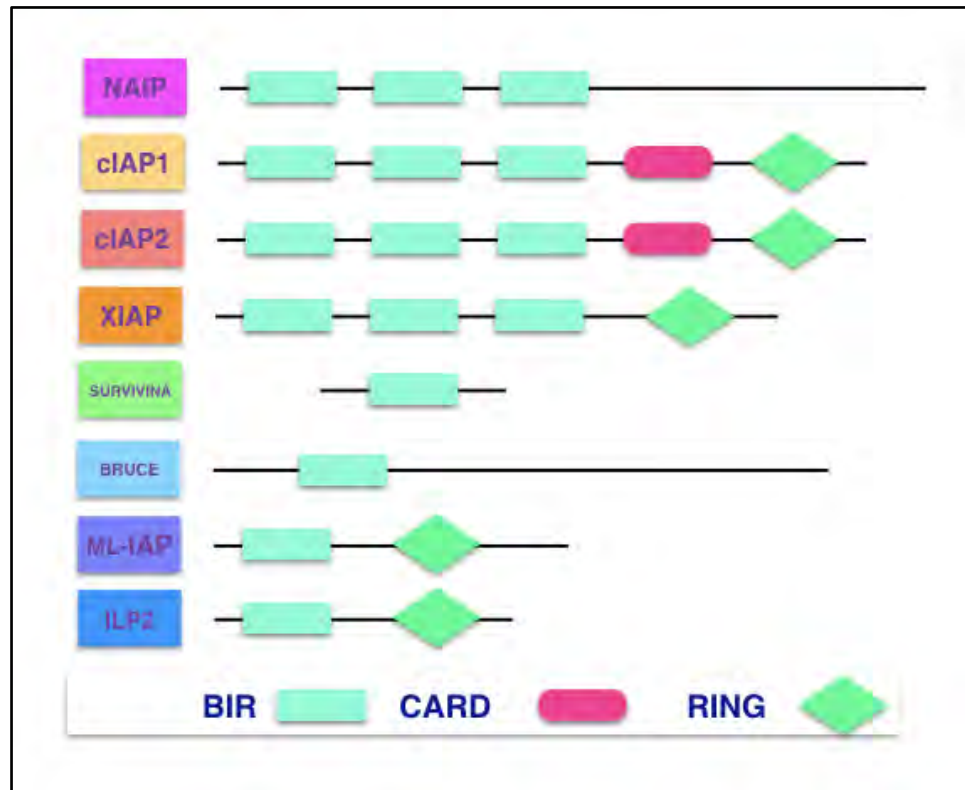


Figura 2-Miembros y dominios presentes en las proteínas IAPs: NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP, survivina, BRUCE, ML-IAP y ILP2; donde los rectángulos color turquesa representan el dominio BIR, el óvalo color rosa representa el dominio CARD y el rombo color verde representa el dominio RING.

## Dominio BIR

Como se había mencionado anteriormente la característica principal de todos los miembros de la familia IAP es la presencia de por lo menos un dominio BIR. Este dominio se caracteriza por un número de aminoácidos invariante entre los que se encuentran tres cisteínas conservadas y un residuo de histidina. Presenta una longitud aproximadamente de 70 aminoácidos, este dominio es el de mayor importancia ya que es el que les confiere la actividad anti-apoptótica (*Budhidarmo y Day, 2014*).



El mecanismo por el cual se inhibe la apoptosis se da mediante la fuerte unión de este dominio con las caspasas presentes en el proceso de apoptosis; por ejemplo, se ha reportado que *XIAP* puede inhibir el proceso de apoptosis mediante dos mecanismos: el primero de ellos es mediante la unión de un motivo de cuatro residuos conservados de la Caspasa-9 (Ala-Thr-Pro-Phe) con el tercer dominio BIR (BIR3) presente en la proteína *XIAP*, evitando la posterior unión de esta caspasa con la procaspasa-3 dando como resultado la inhibición de la apoptosis. El segundo se da mediante la unión del segundo dominio BIR (BIR2) con las caspasas efectoras, así como la unión de un centro inespecífico del dominio BIR1 y BIR2 con el sitio activo de la caspasa-3 y la caspasa-7; restringiendo el acceso a sus sustratos (*Budhidarmo y Day, 2014*).

- **Dominio RING y CARD**

El dominio RING, es un tipo de dedo de zinc, este no es un dominio único de las proteínas IAPs. Además de encontrarse en la mayoría de las IAPs, este también se encuentra presente en diversas proteínas. Este dominio presenta actividad ligasa de ubiquitina, por lo cual promueve el proceso de ubiquitinación; mecanismo por el cual se degradan las proteínas a través del proteosoma. Mientras que el dominio CARD media la interacción proteína-proteína, permitiendo la formación de homodímeros o heterodímeros; tal es el caso de la proteína cIAP1 y la proteína cIAP2 las cuales pueden unirse, y así participar de manera alterna en la formación del apoptosoma (*Verhagen y Coulson, 2001*).



- **Miembros de la familia IAP**

*NAIP* o *BIRC1* conocida también como: *proteína inhibidora de la apoptosis neuronal*, se descubrió en la enfermedad conocida como atrofia muscular, por la cercanía de la secuencia en el gen blanco donde se lleva a cabo la mutación de dicha enfermedad y donde también se codifica el gen *BIRC1*. Se tienen evidencias de que *NAIP* evita el proceso de apoptosis de las neuronas motoras y no en las neuronas sensoriales, es decir; tiene actividad tejido específico y evita el proceso de apoptosis mediante la unión a las caspasas 3,7 y 9 en presencia de ATP, pero aún no se han comprobado dichas teorías (*Budhidarmo y Day, 2014, Saleem y Muhammad, 2013*).

*clAP1* o *BIRC2* y *clAP2* o *BIRC3*. Estructuralmente estas proteínas, cuentan con tres dominios BIR los cuales presentan funciones diferentes entre sí, un dominio CARD y un dominio RING (figura 2). Estas proteínas inhiben el proceso de apoptosis por su unión con la caspasa-8 y la caspasa-9 (*Martinez y Morán, 2004*). Además, estas proteínas participan en diferentes procesos, ya que son un importante regulador de la inmunidad innata, promueven la progresión de la inflamación (*Sharma y Thomas, 2016*) y participan como moduladores de diferentes vías de señalización; que incluyen la activación del factor nuclear *NF- $\kappa$ B* y la proteína cinasa activada por mitógeno *MAPK*; las cuales están involucradas en la regulación de procesos como la división, diferenciación celular y el metabolismo de metales pesados, entre otros (*Sharma y Thomas, 2016*).



*XIAP* o *BIRC4*, es el miembro más estudiado y representativo de la familia IAP, estructuralmente cuenta con tres dominios BIR al igual que *cIAP1* y *cIAP2* y un dominio RING (figura 2) (*Saleem y Muhammad, 2013*), esta proteína se expresa en el citoplasma y es la proteína más relacionada con la inhibición de la apoptosis ya que se ha descrito que puede unirse a: caspasa-3, caspasa-7 y la caspasa-9 (*Budhidarmo y Day, 2014*); mediante los mecanismos que se describirá más adelante.

*Survivina* o *BIRC5* y *BRUCE* o *BIRC6*; estas proteínas además de participar en el proceso de apoptosis también cumplen una importante función en diferentes etapas del ciclo celular, ambas cuentan con un solo dominio BIR, aunque la longitud varía en ambas proteínas (figura 2) (*Saleem y Muhammad, 2013*). *Survivina* es el miembro más pequeño de la familia IAPs y participa de forma determinante en el proceso de división celular, tema que se retomará más adelante. Se ha reportado que evita el proceso de apoptosis por medio de la unión con la caspasa-9 (*Hassan y Hidemichi, 2014*). Mientras que, la proteína *Bruce* se encuentra en un gran número de tejidos como lo son: el cerebro, los testículos las células linfáticas y a nivel transcripcional se encuentra en las membranas de la red trans del aparato de Golgi (TGN) y en el sistema endosomal (*Saleem y Muhammad, 2013*). *BRUCE* evita la apoptosis por medio de su unión a las caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7 y caspasa-9 y participa en la promoción de la citocinesis (*Garrison y Chunmin, 2015*).



*ML-IAP* o BIRC7 y *ILP2* o BIRC 8, *ML-IAP*: al igual que algunas IAPs, es una proteína que únicamente se expresa en tejido embrionario y en algunos tipos de cáncer; no se expresa en tejidos adultos sanos, esta proteína inhibe el proceso de apoptosis por medio de su unión con la procaspasa-3 y la procaspasa-7 (*Budhidarmo y Day, 2014*). Mientras que *ILP2* es una proteína que también se le considera parte de la súper familia de las inmunoglobulinas, ya que interactúa con varios receptores leucocitarios tipo Ig, células asesinas NK, entre otros. Esta proteína evita el proceso de apoptosis mediante su unión con la caspasa-9 (*Saleem y Muhammad, 2013*).





## Survivina

La survivina o BIRC5, es una proteína altamente conservada en la familia de las IAPs, es el miembro más pequeño ya que solo cuenta con un dominio BIR, además de un extenso carboxilo terminal con conformación de alfa hélice, cuenta con un total de 142 aminoácidos (figura 2), tiene un peso molecular de 16.5 kDa. Esta proteína se presenta principalmente en estado homodimérico, pero diferentes estudios han demostrado que el alfa hélice terminal presente en ella, le permite la formación estable de heterodímeros, es decir, le permite la unión con otras proteínas, como por ejemplo: la unión a Borealina en el complejo cromosomal pasajero (Budhidarmo y Day, 2014; Mobahat y Narendran, 2014).

El gen de survivina se localiza en el cromosoma 17 “17q25” (Altieri, 2008), su estructura consta de cuatro exones, tres intrones y mediante splicing alternativo, puede generar cinco isoformas: *survivina wt*, *survivina DEX3*, *survivina 2B*, *survivina 2 $\alpha$* , y *survivina 3B* (Noton y Clnaghi, 2005). La *survivina wt* que fue la primera isoforma descrita, está conformada por 4 exones, y es la más estudiada hasta el momento. a *survivina DEX3* solo cuenta con el exón 1, 2 y el 4. La *survivina 2B* también cuenta con sus cuatro exones pero además, entre el exón 2 y el exón 3 se le incorpora parte del intrón 2, el cual da lugar al exón 2B y es además la isoforma de mayor tamaño con 165 aminoácidos. La *survivina 2 $\alpha$*  cuenta únicamente con el exón 1, 2 e integra una pequeña parte de la región 3 UTR, siendo esta la isoforma más corta con 74 aa y finalmente la *survivina 3B*, la cual cuenta con los exones 1,

2, 3 e integra una región correspondiente al intrón 3, lo que genera el exón 3B (figura 3) (Noton y Clinaghi, 2005; Caldas, 2005).

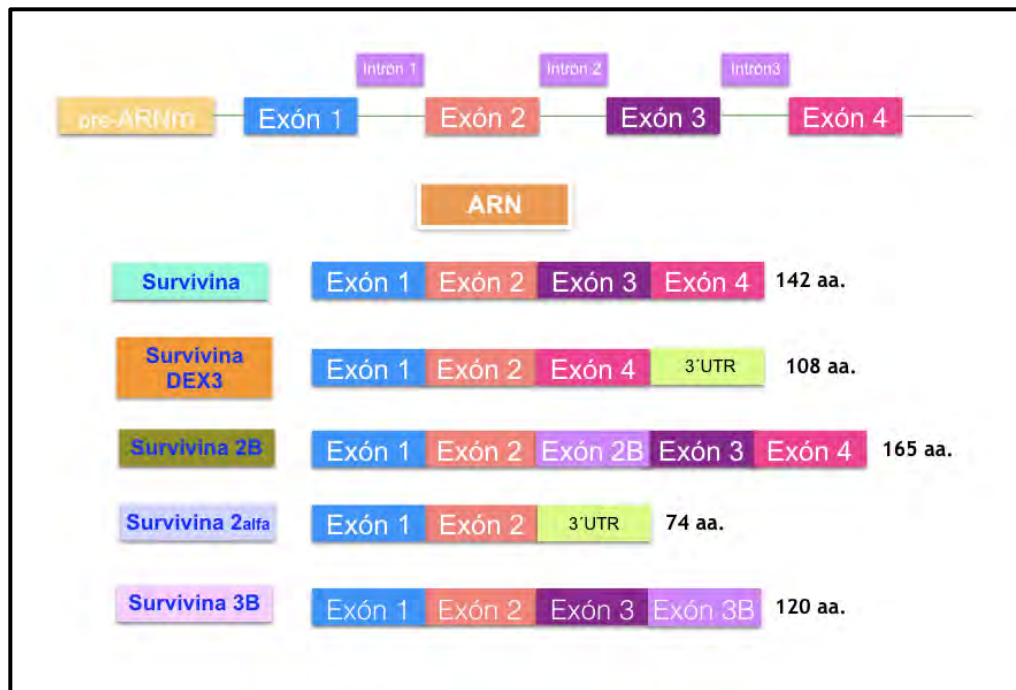


Figura 3- Isoformas de Survivina; Survivina wt, Survivina DEX3, Survivina 2B, Survivina 2 $\alpha$  y Survivina 3B.

La survivina tiene una alta expresión durante el desarrollo embrionario, así como también en diversos tipos de cáncer y se ha reportado que posee una baja expresión en células y tejidos sanos que como: células T, células hematopoyéticas, células endoteliales del sistema vascular, células del hígado, células eritroides y en el tracto gastrointestinal (Mobahat y Narendran, 2014).



## Funciones de la survivina

- **La Survivina en la división celular**

Dentro de las funciones de la survivina, se encuentra la regulación del proceso de división celular. Siendo la survivina wt la única isoforma que participa en dicho proceso y se ha observado que está involucrada en el punto de control CHEK2 el cual regula el paso a la fase G2 en el ciclo celular (*Altieri, 2008; Mobahat y Narendran, 2014*).

La survivina wt forma parte del complejo pasajero cromosomal “CPC”, junto con Borealina, Aurora B y INCENP (Figura 4). Dicho complejo se une a los centrómeros estabilizando la unión del uso mitótico al cinetocoro, lo que permite la perfecta segregación de los cromosomas en la división celular. El papel de survivina en la formación del CPC es clave, ya que se ha observado en estudios con ratones que la inhibición de survivina en el proceso de mitosis da como resultado la muerte del embrión, debido a que se ocasiona una imperfecta segregación cromosomal (*Selvaraj y Fang, 2013*).

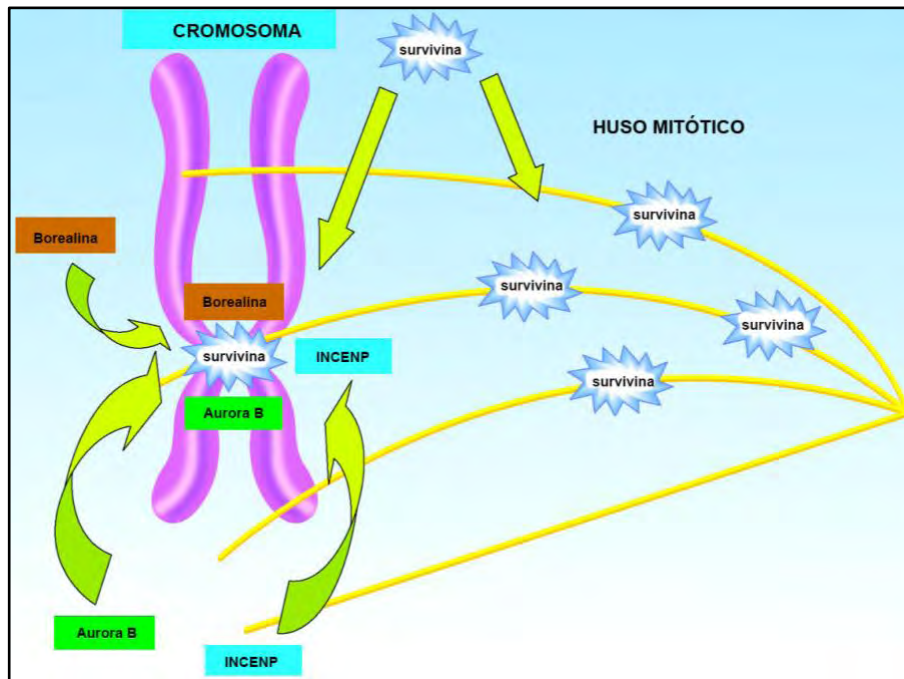


Figura 4-Complejo pasajero cromosomal "CPC". Imagen tomada y modificada (Mita y Nawrocki, 2008).

- **Survivina y apoptosis**

Se han descrito varios mecanismos por los cuales survivina es capaz de inhibir el proceso de apoptosis. Se cree que el dominio BIR presente en su estructura da la característica anti-apoptótica, confiriéndole la capacidad de unirse directamente con las caspasas y evitar dicho proceso. Algunos estudios proponen que la survivina es capaz de unirse directamente con la caspasa-3 y la caspasa-7 (Selvaraj y Fang, 2013); aunque el mecanismo exacto aún se desconoce. Por otro lado, también hay estudios que sugieren que survivina no puede inhibir la actividad de las caspasas de forma directa, por lo que, la participación de survivina en la inhibición directa de la apoptosis es muy controversial (Mobahat y Narendran, 2014).



El mecanismo mejor descrito por el cual survivina evita el proceso de apoptosis, es mediante la participación indirecta con otros miembros de las proteínas IAP, potencializando la actividad anti-apoptótica, tal es el caso de su unión con la proteína XIAP; lo que da lugar a la formación del heterodímero Survivina-XIAP, el cual es mucho más estable que la proteína XIAP por sí sola, tiene una mayor afinidad por la caspasa-9, por lo que se une fuertemente a esta, evitando de esta forma el proceso de apoptosis (*Selvaraj y Fang, 2013*). También se sabe que survivina es un regulador de diferentes proteínas importantes en el proceso de apoptosis, tal es el caso de la regulación negativa de p53 tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel de proteína; lo que sugiere su posible participación como regulador secundario del proceso de apoptosis a través de la inhibición de p53 (*Mobahat y Narendran, 2014*). Así pues, survivina ya sea directa o indirectamente tiene un papel importante en la inhibición del proceso de apoptosis.

La participación de la survivina ya sea directa o indirecta, en la inhibición del proceso de apoptosis, la involucra en el desarrollo del cáncer. Así pues, se ha encontrado que survivina se expresa en diversos tipos de cáncer, además, la proteína se expresa durante las primeras etapas del proceso carcinogénico de manera constante. Algunos de los tipos de cáncer donde se ha visto expresada son: cáncer de mama, cáncer cervicouterino, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, linfocitos y cáncer gástrico (*Mobahat y Narendran, 2014*).



La survivina se expresa selectivamente en los diferentes tipos de cáncer y su expresión se asocia a la agresividad de la enfermedad, ya que la detección de survivina en pacientes con cáncer se ha relacionado con un pronóstico desfavorable. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de survivina en pacientes con cáncer de mama se asocia significativamente con varios parámetros clínico-patológicos desfavorables como: la infiltración de vasos, incremento de la masa tumoral, afección gangliar, expresión de HER-2, etc. (*Selvaraj y Fang, 2013*). También se ha reportado que la presencia de survivina, está altamente relacionado con el proceso metastásico en los ganglios linfáticos en cáncer gástrico, lo que también conlleva a un mal pronóstico en los pacientes (*Krieg y Billur, 2013*). La survivina también se asocia a la quimioresistencia y radioresistencia; principales terapias empleadas contra el cáncer. Situando a survivina como un potencial blanco en la terapia contra el cáncer. Además, debido a estas características varios estudios sugieren la utilización de survivina como un posible marcador diagnóstico y pronóstico (*Mobahat y Narendran, 2014*).

Dentro de las isoformas de la survivina algunos miembros tienen actividad pro-apoptótica y otras anti-apoptótica, se sabe que las isoformas anti-apoptóticas son: survivina DEX3 y survivina 3B; mientras que las isoformas; survivina 2B y survivina 2 $\alpha$  tienen características pro-apoptóticas (*Khan y Ferguson 2014*).

## hnRNPs

Las hnRNPs “Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares” son un conjunto de proteínas principalmente nucleares, las cuales en su mayoría se unen al transcrito nascente producido por la ARN polimerasa II. Estas proteínas modificadoras cuentan con diferentes dominios en su estructura, por lo que el contenido de dominios, así como la longitud de cada proteína es sumamente variable (figura 5). Este grupo de proteínas suma más de 20 miembros tomando en cuenta las isoformas generadas por splicing alternativo de cada miembro y están nombradas de la A-U (*Chen y Min, 2013*).

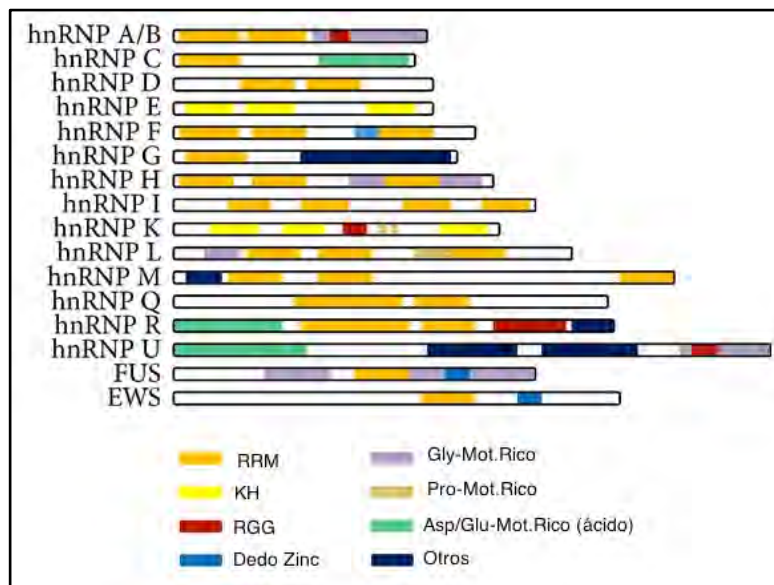


Figura 5-Miembros de la familia de proteínas hnRNPs. Imagen tomada y modificada (Chen y Min, 2013).



Estas proteínas tienen diferentes pesos moleculares que van de los 34 kDa a los 120 kDa, en cuanto a su estructura, se identificaron cuatro dominios característicos de unión a ARN (*Geuens y Delphine, 2016*) los cuales son: dominios “RRM” por sus siglas en inglés “*RNA recognition motif*” (motivo de reconocimiento de ARN), el cual tiene una longitud aproximada de 90 aminoácidos (*Krecic y Swanson, 1990*). Este dominio es el encargado de mediar la interacción de las hnRNPs con los ácidos nucleicos de una sola hebra ARNm y ssADN, cada hnRNP posee uno o varios dominios RRM a excepción de hnRNP U, por lo cual también sus funciones varían entre cada miembro; confiriéndole así una amplia diversidad en los procesos biológicos en los cuales participan (*Chen y Min, 2013*). Además poseen el motivo tipo-RRM (*Geuens y Delphine, 2016*), cajas RGG que consisten en repeticiones de tripéptidos formados por Arg-Gly-Gly con aminoácidos aromáticos intercalados y finalmente dominios “KH” (K-homologo) el cual es otro dominio de reconocimiento a ácidos nucleicos, este dominio presenta menor afinidad, por lo que se necesitan varias copias de este para obtener una unión más estable con los ácidos nucleicos (*Chen y Min, 2013*).

Además, de los dominios ya mencionados, este grupo contiene diferentes dominios auxiliares con composiciones de aminoácidos ácidos distintivos, por ejemplo: glicina o prolina, estos dominios no son exclusivos de la familia (*Ping y Hang, 2010*) (figura 5). Además, la especificidad de unión de las hnRNPs al ARN esta mediada en gran parte por la estructura 3D de cada proteína en las regiones estructurales alrededor de los RRM ya que esto determina la interacción ARN-proteína (*Geuens y Delphine, 2016*).



Las hnRNPs participan de manera importante en múltiples aspectos del metabolismo de los ácidos nucleicos entre los que incluyen: la estabilidad de los transcritos nacientes, la maduración de los ARN mensajeros, la estabilidad del ARN mensajero durante su transporte, entre otros (Geuens y Delphine, 2016). Además, se sabe que poseen la característica de poder localizarse tanto en núcleo como en citoplasma a excepción de hnRNP C y U, que no pueden salir del núcleo y que llevan a cabo la mayoría de sus funciones dentro de él. Esta familia de proteínas también participa en la regulación del proceso de splicing alternativo, como los miembros A1, A2 y B1 los cuales participan en la selección del sitio de splicing, dando lugar a la síntesis de diferentes isoformas de una proteína (Ping y Hang, 2010), además estudios recientes relacionan a estas proteínas con la regulación en la diferenciación de *células madre* (Chen y Min, 2013).

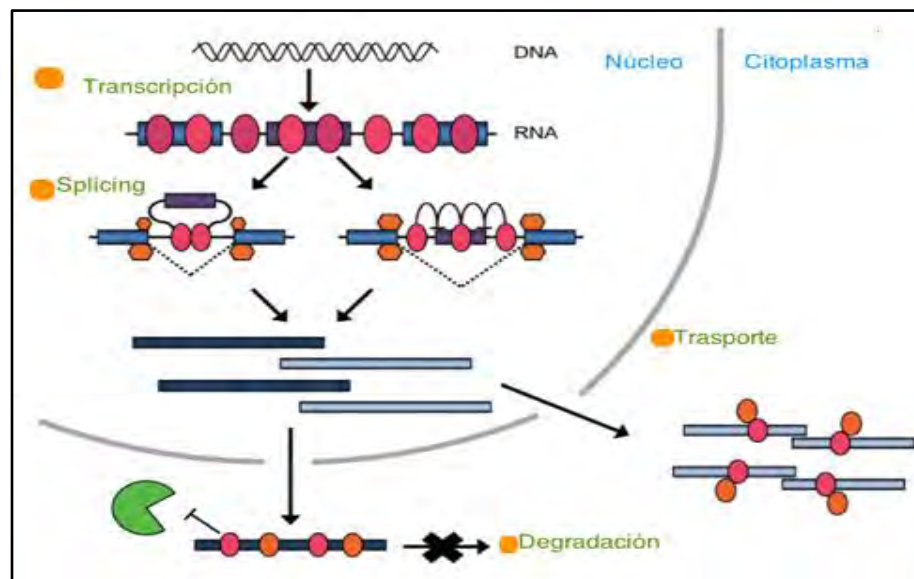


Figura 6-Procesos en los que participan las hnRNPs; donde las hnRNPs están representadas por los óvalos color rosa y naranja, el ARN y ADN por las barras en color gris y azul, el círculo verde representa el proteosoma. Imagen tomada y modificada (Ping y Hang, 2010).



La participación de estas proteínas con los diferentes procesos del metabolismo del ARN las relaciona directamente con la regulación de la expresión génica. Estudios recientes relacionan algunos de sus miembros con patologías como el cáncer, ya que se ha observado que el nivel de expresión de hnRNPs se altera en diferentes tipos de cáncer, también se les relaciona con diferentes enfermedades neurodegenerativas, como: la atrofia muscular espinal, la esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer y demencia del lóbulo fronto-temporal (*Geuens y Delphine, 2016*).

Aún falta por conocer muchos de los procesos en los que participan este grupo de proteínas, ya que muchas de las funciones biológicas atribuidas a las hnRNPs implican interacciones dinámicas y cooperativas dentro de un gran número de proteínas, por lo que realizar estudios sobre las funciones de varios de los miembros es de suma importancia, ya que a la fecha solo se sabe la función de un número muy reducido de proteínas de esta familia (*Ping y Hang, 2010*).



## hnRNP H1

La proteína hnRNP H1 se encuentra ubicada en el cromosoma 5 (5q35.3) (*Evans y Glen, 1999*), esta proteína se encuentra principalmente en el núcleo, tiene un peso molecular aproximado de 56 kDa (*Geuens y Delphine, 2016*), estructuralmente cuenta con tres dominios RRM, permitiéndole la unión a regiones poli-G (ricas en guaninas) (*Ping y Hang, 2010*).

Por lo extenso de la familia, las hnRNPs se han clasificado en subgrupos para facilitar su estudio (figura 7), los cuales se forman según las características estructurales y funcionales que comparten algunas de los miembros de la familia, tal es el caso del grupo hnRNP H/F, el cual está constituido por la proteína hnRNP F y la proteína hnRNP H la cual presenta tres ortólogos: la proteína hnRNP H1 que en algunos trabajos se refieren a ella únicamente como hnRNP H, la proteína hnRNP H2 y la proteína hnRNP H3 que presenta dos isoformas hnRNP H3a y hnRNP H3b (*Mauger y Lin, 2008*); este grupo poseen tres dominios RRM y la similitud entre este grupo de proteínas varía tanto a nivel de aminoácidos como a nivel de nucleótidos, incluso algunas solo comparten similitud en fragmentos. Por ejemplo (figura 7); hnRNP H1 y hnRNPH2 son 96 % idénticas a nivel de aminoácidos, mientras que hnRNP F y hnRNP H1 tienen una similitud a nivel de aminoácidos de 68 % pero poseen idéntico el primer dominio RRM, en cuanto a hnRNP H3 y hnRNP H1 solo tiene un 48 % de similitud a nivel de nucleótidos, pero 71 % de similitud en la región que abarcan los dos últimos dominios RRM (*Mauger y Carolina, 2008*).

Los tres dominios RRM presentes en su estructura les permite la unión específica a secuencias ricas en guaninas (*Ping y Hang, 2010, Mauger y Lin, 2008*). Además, estas proteínas tienen un papel importante en el proceso de splicing alternativo (*Huelga y Vu, 2012*) y estudios recientes relacionan a hnRNP H1 con el proceso carcinogénico, ya que se identificó a hnRNP H1 como la causante de las variantes de splicing del ARNm de HER2, y como es sabido esta proteína es sumamente importante en pacientes con cáncer de mama (*Geuens y Delphine, 2016*).

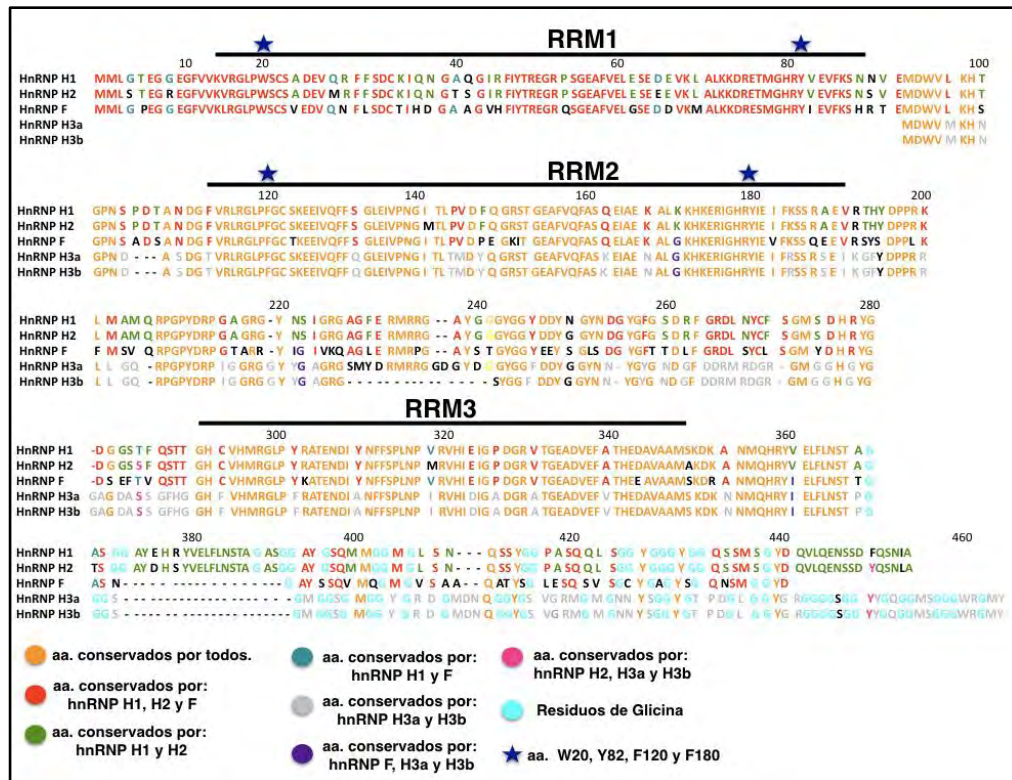


Figura 7-Representación del grupo de proteínas hnRNP F/H. Los aminoácidos en color rojo y naranja es donde comparten similitud., en los dominios RRM. Los aminoácidos marcados con una estrella corresponden a los conservados por todos los miembros y se ha visto que participan directamente con el reconocimiento del ARN y finalmente en la imagen se resaltan los residuos de Glicina.

(Gen Bank, números de acceso: hnRNP H1 (NP\_001027565), hnRNP H2 (NP\_001027565), hnRNP F (NP\_0010917), hnRNP H3a (NP\_036334) y hnRNP H3b (NP\_067676.2).

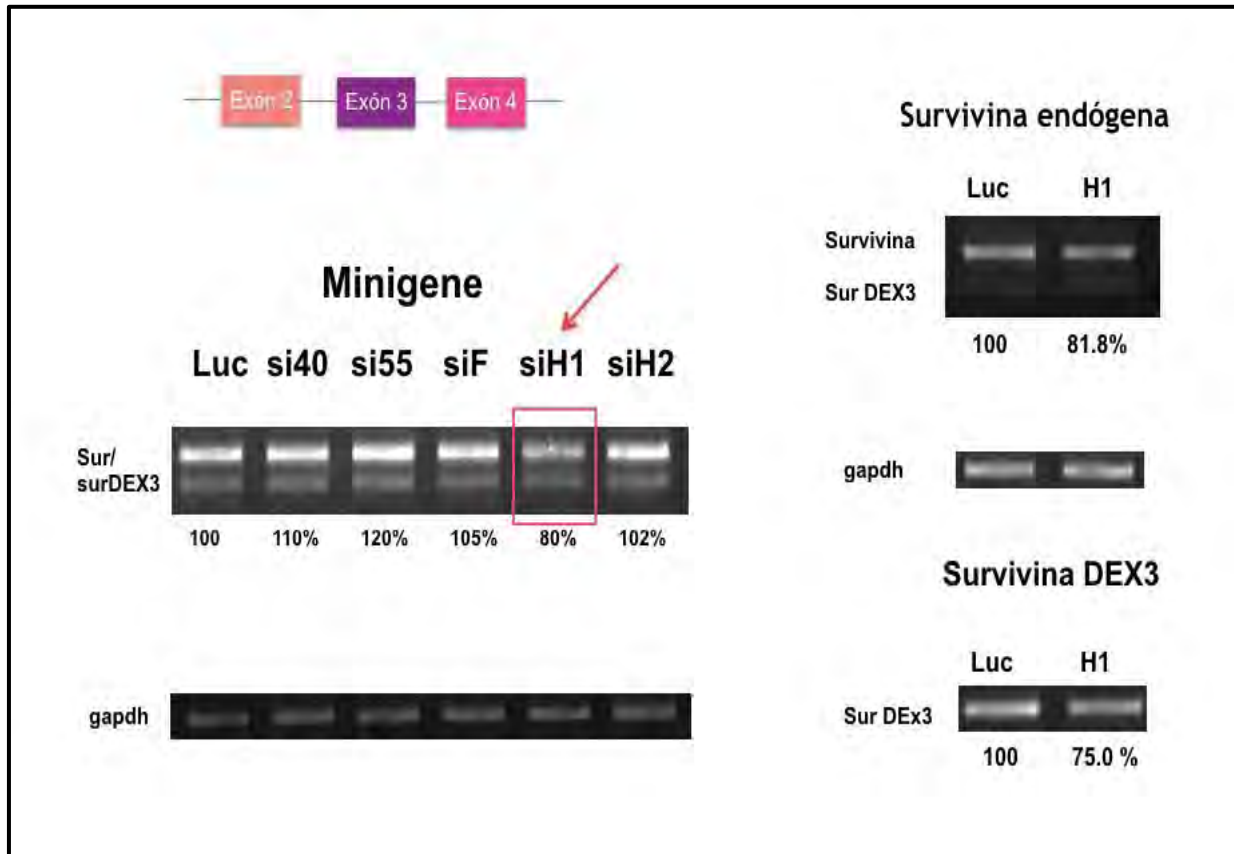


## Antecedentes experimentales

Debido a que la survivina y sus isoformas tienen un papel importante en el proceso de apoptosis y en el desarrollo del cáncer, conocer y entender que mecanismos que regulan su expresión han adquirido suma importancia en el estudio de este importante padecimiento. Se han encontrado varios reguladores de la expresión de survivina entre los que se encuentra: p53, NF-kB, c-myc, entre otros (*Papanikolaou y Iliopoulos, 2011*).

En la figura 8 se muestran resultados de estudios previos realizados en el laboratorio (*Gaytán, González y Maldonado, 2017*), los cuales sugieren que la proteína hnRNP H1, posiblemente está participando en la regulación de la expresión de survivina. El experimento consistió, en la construcción de un minigen de survivina (figura 8A), el cual contenía únicamente los exones 2, 3 y parte del 4, así como 700 pb de los intrones 2 y 3; posteriormente se evaluó si la reducción de las proteínas SR40, SR55, hnRNP F, hnRNP H1 y hnRNP H2 (figura 8B), mediante el uso de ARN de interferencia para cada proteína, afectaban la regulación del splicing alternativo del minigen de survivina.

Se observó que la expresión del minigen de survivina disminuía únicamente cuando no había la proteína hnRNP H1 y no así cuando se inhibía al resto de las proteínas. Lo que sugirió una posible interacción entre la proteína hnRNP H1 con el ARNm de survivina (figura 8B).



**Figura 8-** Evaluación de la expresión de la survivina y survivina DEX3 en la línea celular HeLa transfectada con los ARNi de interferencia para las proteínas Sr y hnRNPs correspondientes. **A.** Esquema de la construcción del minigene. **B.** Evaluación del efecto de los diferentes ARN de interferencia, en la expresión del minigene de survivina; donde si40 es el ARNi contra la proteína SR40, si55 es el ARNi contra la proteína SR55, siF es el ARNi contra la proteína hnRNP F, siH1 es el ARNi contra la proteína hnRNP H1, siH2 es el ARNi contra la proteína hnRNP H2, LUC es el control negativo y gapdh es un gen constitutivo para la normalización del PCR semi- cuantitativas. **C.** Determinación del efecto del ARNi contra la proteína hnRNP H1 sobre el ARN mensajero de survivina endógena. **D.** Determinación del efecto del ARNi contra la proteína hnRNP H1 sobre el ARNm de la isoforma DEX3 de survivina.



Posteriormente, con el fin de corroborar la participación de hnRNP H1 en la regulación de la survivina se evaluó la expresión del ARN mensajero de la survivina (figura 8C) y de la isoforma survivina DEX3, endógenas (figura 8D); en dicho experimento, se observó una tendencia a disminuir similar a la observada con el minigen, cuando se inhibía la proteína hnRNPH1 aunque en menor proporción; por lo cual, el resultado sugirió que la proteína hnRNP H1 probablemente podría estar participando en el procesamiento del ARN mensajero de survivina wt y survivina DEX3; pero no a nivel de splicing alternativo, ya que ambas isoformas disminuían cuando disminuía hnRNP H1. Por lo cual, era necesario realizar más experimentos para determinar el tipo de mecanismo que estaba llevando a cabo la proteína hnRNP H1 en la expresión de survivina y de alguna de sus isoformas.



## Hipótesis

hnRNP H1 regula la expresión de survivina y de algunas de sus isoformas.





## Objetivos

### General:

Determinar el papel de la proteína hnRNP H1 en la expresión de la survivina wt y algunas de sus isoformas en las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino HeLa y cáncer de mama MCF-7.

### Específicos:

- 1.-Determinar el efecto de la inhibición de hnRNP H1 en la expresión del ARN mensajero de survivina, survivina DEX3 y survivina 2B; en las líneas celulares HeLa y MCF-7.
- 2.-Determinar el efecto de la inhibición de hnRNP H1 en la expresión de la proteína survivina, survivina DEX3 y survivina 2B en las líneas celulares HeLa y MCF-7.
- 3.-Obtener la línea celular estable con el ARNi de hnRNP H1, en la línea celular HeLa y evaluar el efecto sobre el crecimiento celular mediante el ensayo LDA.
- 4.-Obtener la línea celular estable con el ARNi de hnRNP H1 en células MCF-7, y determinar el efecto en la formación de esferoides.



## Material y Método

### Cultivo celular

Se emplearon las líneas celulares HeLa y MCF-7 (ATCC). Estas se cultivaron con medio DMEM (marca: ATCC), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a una temperatura de 37°C y con 5 % CO<sub>2</sub>. Antes de ser empleadas en los diferentes protocolos experimentales se realizaba a la línea celular al menos un pase.

### Trasfección

Se transfectaron los ARN de interferencia denominados: siLuc (este fue utilizado como control) y siH1 (ARNi contra hnRNP H1), el cual se le denominará también como H1 en el presente trabajo, ambos fueron clonados en el vector pSIREN-Retro-Q (Clontech, No.Cat. 631526).

- **Trasfección de células MCF-7**

Para la línea celular MCF-7 se empleó el reactivo *Escort*<sup>TM</sup> (SIGMA E9770); siguiendo el protocolo del fabricante, brevemente el procedimiento fue el siguiente (Procedimiento para 250,000 células sembradas en un pozo de 35 mm). En un tubo de 1.5 mL se colocaron: 1) 250 µL de medio DMEM sin suero, 2) 15 µL de *Escort* y 3) 4 µg de plásmido, la mezcla se dejó incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, se retiró el medio a la placa de células de 35 mm y se les agregaron por goteo los 250 ul de la mezcla anterior, dejando incubar durante 5 h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo se agregó 1.3 mL de medio DMEM con suero, aproximadamente 12 h después se cambió el medio por 2 mL de DMEM nuevo con suero para finalmente a las 48 h extraer ARN o proteína.



- **Transfección de células HeLa**

Para la transfección de la línea celular HeLa se empleó lipofectamine® 2000 Invitrogen 11668-019, siguiendo el protocolo del fabricante, brevemente el procedimiento fue el siguiente (procedimiento para 250,000 células, sembradas en un pozo de 35 mm): en dos tubos diferentes de 1.5 mL se colocaron 250  $\mu$ L de medio DMEM sin suero, posteriormente a uno se le agregaron 4  $\mu$ g de plásmido y al otro se le agregaron 10  $\mu$ L de lipofectamina, se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se mezcló suavemente el contenido de ambos tubos, se dejó nuevamente incubando por 30 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se retiró el medio a la placa de células de 35 mm y se les adicionó la mezcla de liposoma y plásmido, dejándola durante 6 horas a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, después se cambió el medio por 2 mL de DMEM con suero y finalmente 48 h se extrajo ARN o proteína para su análisis.

### Líneas estables HeLa y MCF-7

Para obtener las líneas celulares estables, se utilizó Puromicina como antibiótico para la selección. En el caso de la línea MCF-7 se utilizó una concentración de 0.3  $\mu$ g/mL de Puromicina; mientras que para la línea HeLa se utilizó una concentración de 2  $\mu$ g/mL de Puromicina. La selección se realizó por aproximadamente 14 días.



## Extracción de ARN y proteína

- **Extracción de ARN total.**

Para la extracción se empleó el kit RNeasy Mini kit 250 de QIAGEN con número de catálogo 74106. Se siguió el protocolo del fabricante; únicamente modificando el paso número uno ya que el Buffer PEC empleado para lisar, se agregó directamente en la caja de células después de realizar un lavado con PBS y se dejó durante 10 min, recuperando la muestra pasado ese tiempo para continuar con la técnica descrita en el manual, brevemente el procedimiento es el siguiente: una vez lisadas las células se les agregó 350  $\mu$ L de etanol al 70 % para lavar, posteriormente la mezcla se vertió a una columna, la cual se centrifugó 15 s a 10 000 rpm, se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados; el primero con 700  $\mu$ L del buffer BW1 centrifugando 15 s a 10 000 rpm, el segundo con 500  $\mu$ L del buffer RPE y se centrifugó 15 s a 10 000 rpm y el tercero con 500  $\mu$ L buffer RPE centrifugando ahora 2 min a 10 000 rpm, se retiró el desecho y se centrifugo nuevamente para secar la columna durante 1 min a 12 500 rpm, posteriormente la columna se transfirió a un microtubo, para finalmente recuperar el ARN en 50  $\mu$ L de agua libre de RNAsas a la columna y se centrifugo 1 min a 10 000 rpm.

- **Extracción de RNA total (trizol).**

Se utilizó el reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante, brevemente la técnica consiste en: lavar las células con 1 mL de PBS 1X, posteriormente con 1 mL de PBS 1X se realizó un raspado a la caja recuperando las células en un microtubo, se centrifugó (2000 rpm, 2 min, en nanocentrífuga), se descartó el sobrenadante y al botón se le adicionó 1 mL de trizol, se dejó incubar 10 min a T.A, posteriormente se les agregó 200  $\mu$ L de cloroformo y se agitó, se incubó en hielo por 10 min; pasado el tiempo se centrifugaron 10 min a 8000rpm y temperatura de 4°C, con lo cual se obtuvo la formación de tres fases (figura 9); la fase acuosa que es la superior, corresponde a la fracción que contiene el ARN, la interface que contiene proteínas y la tercera corresponde al trizol con DNA, por lo cual, se toma con cuidado la fase acuosa y se coloca en un tubo nuevo. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se dejó precipitar por 1 h en hielo, se volvió a centrifugar por 15 min a 4°C con una velocidad de 10,000 rpm, se recuperó el botón y se lavó con 1000  $\mu$ L de etanol al 70 %, centrifugando por 5 min a 10000 rpm a una temperatura de 4°C, se dejó secar el pellet como máximo 5 min para finalmente disolver el botón en 20  $\mu$ L de agua libre de RNAsas.



Figura 9- Formación de fases, extracción con trizol.



- **Extracción de proteína.**

Las células fueron lavadas con 1 mL de PBS 1X, posteriormente con otro mL de PBS 1X se realizó un raspado a la caja recuperándolas en un tubo nuevo, se centrifugó a 2000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en el buffer RIPA (buffer de lisis celular)+ Pic un inhibidor de proteasas (*protease inhibitor cocktail*) (600 µL de buffer RIPA+Pic por placa de 100 mm), después se incubó durante 20 min en hielo para finalmente centrifugar 10000 rpm, 30 min, 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo para su posterior análisis de proteínas.

### Retrotranscripción y reacción de la cadena de la polimerasa

- **Retrotranscripción (RT)**

Para la reacción de retro transcripción se preparó la siguiente mezcla:

SuperScrip™ VILO™ Master Mix (No. Cat. 11755050)....4µL  
ARN.....1µg  
Agua mili Q.....c.b.p. 20µL

Y se utilizó el siguiente programa:

25 °C	42 °C	85 °C
10:00	60:00	05:00

(Donde los caracteres superiores corresponden a las temperaturas en °C y los caracteres inferiores corresponden al tiempo en minutos).



- **(PCR) Semi-cuantitativo**

Para la reacción de PCR en punto final o semicuantitativo se efectuó la siguiente mezcla con las concentraciones que a continuación se indican: 1.0 mM Buffer con  $MgCl_2$ , 10 mM dntp's, 1.25 uni/reacc. de Amplitaq® gold DNA (enzima), 0.2  $\mu M$  oligonucleótidos sentido, 0.2  $\mu M$  oligonucleótidos anti-sentido, cDNA 50 ng y agua mili Q cbp. 25  $\mu L$ . Posteriormente se colocaron en el termociclador, con los programas que a continuación se presentan:

**OLIGO****SECUENCIA****GAPDH**

Sentido.....5' CCC CTT CAT TGA CCT AACT 3'  
 Anti-sentido...5' TTG TCA TGG ATG ACC TTG GC 3' 19 ciclos

$$\frac{95^{\circ}C}{10:00} ; \frac{95^{\circ}C}{0:30} \frac{60^{\circ}C}{0:30} \frac{72^{\circ}C}{0:30} ; \frac{72^{\circ}C}{5:00}$$
**hnRNP H1**

Sentido.....5' CCC CAG GTC TGT CAT AAG GA 3'  
 Anti-sentido....5' CCC TTT GGA TGT AGC AAG GA 3' 26 ciclos

$$\frac{95^{\circ}C}{10:00} ; \frac{95^{\circ}C}{0:30} \frac{54^{\circ}C}{0:30} \frac{75^{\circ}C}{0:15} ; \frac{72^{\circ}C}{2:00}$$
**SURVIVINA**

Sentido.....5' GCC ATG AAT TCA TGG GTG CCC CGA CGT TGC 3'  
 Anti-sentido....5' AGC TCT CTA GAG AGG CCT CAA TCC ATC GCA 3' 3, 23 ciclos

$$\frac{95^{\circ}C}{10:00} ; \frac{95^{\circ}C}{0:30} \frac{68^{\circ}C}{0:30} \frac{72^{\circ}C}{0:30} \frac{95^{\circ}C}{0:30} \frac{62^{\circ}C}{0:30} \frac{72^{\circ}C}{0:30} ; \frac{72^{\circ}C}{5:00}$$
**SURVIVINA DEX3**

Sentido.....5' ACG ACC CCA TGC AAA GGA AAC CAA CA3'  
 Anti-sentido....5' AAC CCG GGA ATC AAA ACA GCA AAA A3' 35 ciclos

$$\frac{95^{\circ}C}{10:00} ; \frac{95^{\circ}C}{0:30} \frac{63^{\circ}C}{0:30} \frac{75^{\circ}C}{1:00} ; \frac{72^{\circ}C}{5:00}$$
**SURVIVINA 2B**

Sentido.....5' CGA GGC GGG CGG ATC ACG AGA 3'  
 Anti-sentido...5' GCT CGA TGG CAC GGC GCA CTT T3' 35 ciclos

$$\frac{94^{\circ}C}{10:00} ; \frac{94^{\circ}C}{0:30} \frac{65^{\circ}C}{0:30} \frac{72^{\circ}C}{0:30} ; \frac{72^{\circ}C}{5:00}$$







## Inmunoréplica tipo Western Blot

Se realizó un gel de poliacrilamida al 12 %, para separar a las proteínas por su peso, realizando la electroforesis a un voltaje de 100 V. Las proteínas del gel fueron transferidas con una cámara semi-seca (15 V durante 15 min), a una membrana de PVDF (*polifluoruro de vinilideno*), se bloqueó con leche al 5 % en TBS1X Tween por 1 h, posteriormente se colocaron los anticuerpos primarios según se requirió (tabla 1), se dejó incubar toda la noche a 4°C, después se efectuaron 4 lavados de 10 min con 1X de TBS-Tween para colocar el anticuerpo secundario (tabla 1) durante 1 h en agitación a temperatura ambiente, finalmente se aplicaron 5 lavados de 5 min con 1X de TBS-Tween y se efectuó una reacción de quimioluminiscencia con el kit Immobilon western Chemiluminescent HRPsubstrate (MILLIPORE) para determinar la presencia de la proteína.

Anticuerpo	Concentración	Anticuerpo secundario
<b>Anti-HNRNPH1 (241-255 Sigma)</b>	1:2500	Anti-conejo (W4011 Promega) 1:2500
<b>Anti-Survivina (SAB4501459 Sigma)</b>	1:500	
<b>Anti- Gapdh (sc-25778, Sta. Cruz)</b>	1:5000	
<b>Anti-survivina DEX3 (3-ab 3731-200, Abcam)</b>	1:1000	
<b>Anti-survivina 2B (-ab 3729-100, Abcam)</b>	1:1000	

Tabla 2-Anticuerpos, con las cantidades utilizadas previamente estandarizadas y fueron diluidos en TBS 1X Tween.

- **Gel Tris- Tricina**

1-Se realizó el gel de poliacrilamida al 15% para lo cual se empleo lo siguiente:

Solucióonn stock	Gel separador	Gel concentrador
Poliacrilamida/ bisacrilamida 29/1	2.172 mL	0.484mL
Tris-HCl/SDS, pH 8.45 (3M Tris-HCl, 0.3% SDS)	2.0mL	1.24mL
Glicerol	0.634mL	----
PSA 10%	10 µL	10µL
TEMED	3µL	6µL
H <sub>2</sub> O	1.2 mL	3.276mL

Tabla 3-Gel poliacrilamida, transferencia en cámara húmeda.



2- Se monto el equipo y se cargaron las proteínas por pozo, la cantidad de proteína dependió de la estandarización previamente hecha y fue aproximadamente de 0.7-1.6 µg de proteína total. posteriormente se realizó una electroforesis a un voltaje de 100 v, empleando los siguientes buffers y se colocaron como lo indica el esquema:

buffers	
Cátodo	Anodo
0.1 M Tris-Base	0.2 M Tris- HCl
0.1 M Tricina	pH=8.9
0.1 % SDS	



Tabla 4- preparación de buffers, transferencia en cámara húmeda.



3- Después las proteínas del gel se transfirieron en cámara húmeda (100 V durante 2h), a una membrana de PVDF.



4- Se bloqueó con leche al 5 % en TBS1X Tween por 2 h, posteriormente se aplicaron los anticuerpos primarios según se requirió (tabla 2), se dejó incubar toda la noche a 4°C, se efectuaron 4 lavados de 10 min con TBS1X Tween, se colocó el anticuerpo secundario (tabla 2) durante 1h en agitación constante a temperatura ambiente, después se aplicaron 8 lavados con TBS1X Tween durante 5 min y se efectuó una reacción de quimioluminiscencia con el kit (Immobilon western Chemiluminescent HRPsubstrate (MILLIPORE)).



## Formación de Esferoides

Para la formación de esferoides se emplearon trasfecciones estables de la línea celular MCF-7. Una vez obtenidas las líneas celulares estables, se sembraron 1 000 000 células con medio L-15 (marca: ATCC) al 10 % de SFB y con las siguientes condiciones: 37°C con agitación constante de 40 a 60 rpm, en cajas de cultivo para suspensión, se dejaron 3 días en dichas condiciones (evitando la formación de agregados), posteriormente se cambió medio cada tercer día durante 20 días, monitoreando la formación de esferoides.

## LDA (Limiting dilution analysis)

Para el ensayo LDA por sus siglas en inglés “limiting dilution analysis” se emplearon tranfecciones estables de la línea celular HeLa. Una vez obtenidas las líneas estables, se sembraron las siguientes cantidades de células: 160, 120, 80, 40, 20 y 2, por triplicado en una caja de 96 pozos, empleando medio DMEM (marca: ATCC) 10 % SFB, y se mantuvieron por siete días a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>, una vez cumplidos los 7 días se contaron el número de colonias formadas por pozo y posteriormente se tiñeron con cristal violeta. Para determinar viabilidad.

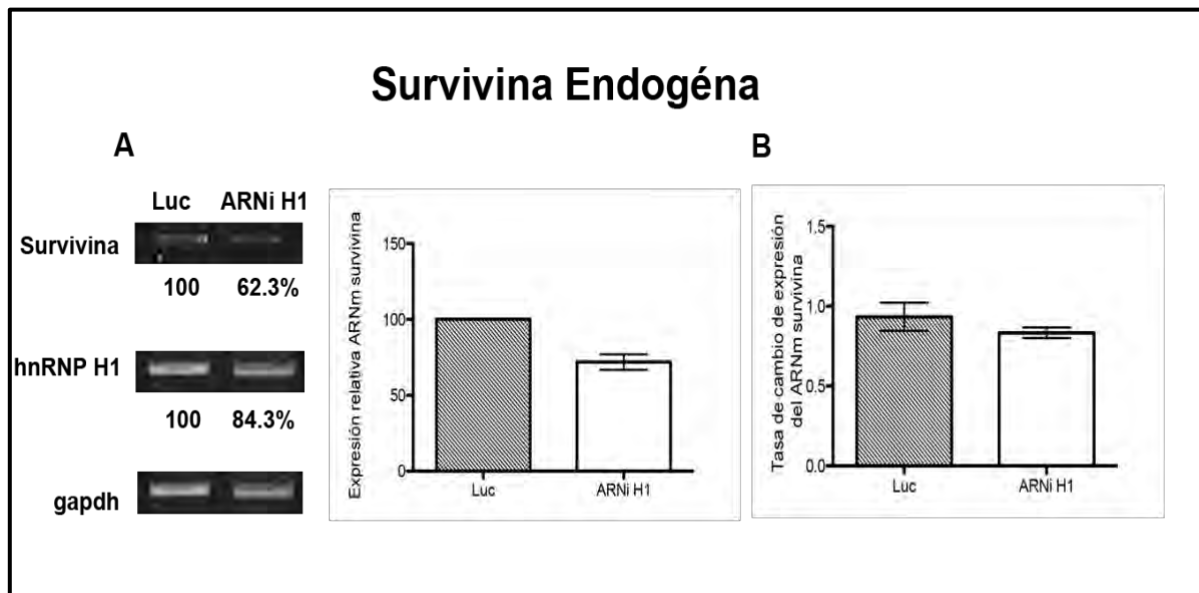


## Tinción con Cristal Violeta

Se desechó el medio de cultivo de la placa, se lavó con PBS, posteriormente se agregó 200  $\mu$ L de etanol por pozo y se colocaron durante 10 min a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , después se retiró el etanol dejando secar los pozos por completo, se les agregó 200  $\mu$ L de cristal violeta durante 10 min para posteriormente realizarle 5 lavados con agua, se dejó secar por 24h, pasado el tiempo, se agregó 200  $\mu$ L de ácido acético por pozo dejando disolver bien y se tomó el contenido de cada uno de los pozos para transferirlo a una nueva placa donde se determinó su absorbancia en el lector de ELISA a 590 nm.

## Resultados y Discusión

**Apartado 1-** Determinación del efecto de la inhibición de hnRNP H1, en la expresión de ARN mensajero de la Survivina, así como de las isoformas survivina DEX3 y survivina 2B.



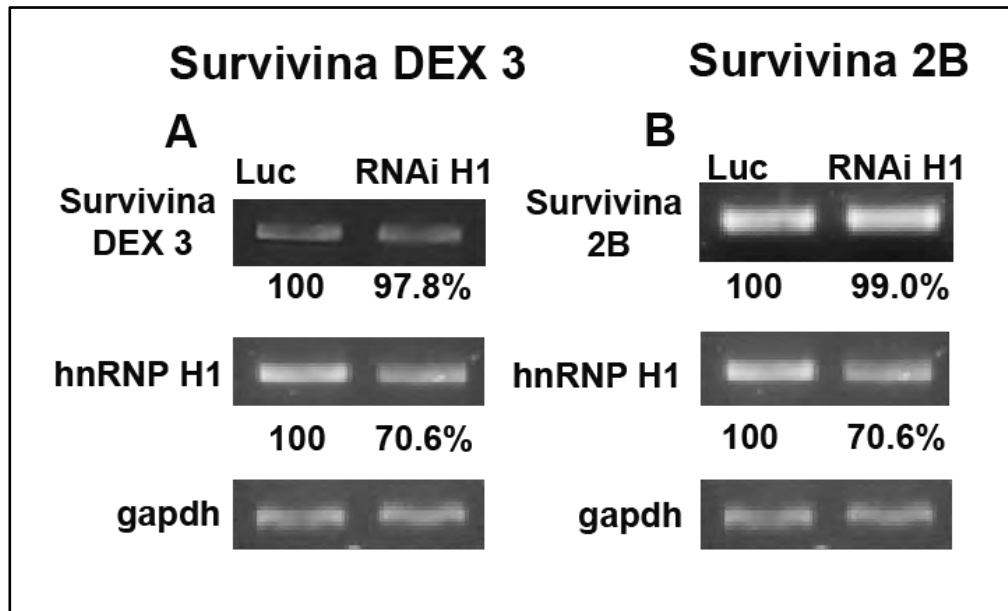
**Figura 10-** Efecto de la Inhibición del ARN mensajero de hnRNP H1 en la expresión de Survivina Endógena en la línea celular HeLa. **A** PCR semi-cuantitativo de células HeLa transfectadas con el ARN de interferencia de hnRNP H1 y la expresión de la survivina endógena. (Se muestra el porcentaje de expresión de cada uno de los ARN mensajeros) y Gráfica de barras de la Expresión relativa de la survivina endógena (n=3)  $p < 0.05$ , media  $\pm$ DS; **B** Gráfica de barras donde observamos el factor de cambio del ARNm de la survivina al inhibir la síntesis de la proteína hnRNP H1 (n=3)  $p < 0.005$  media  $\pm$ DS. En los tres experimentos se empleó gapdh como gen constitutivo para normalizar y se llevaron a cabo trasfecciones transitorias de 48 h.

En el presente trabajo nos referiremos al ARN de interferencia para hnRNP H1 como ARNi H1 y a la isoforma survivina wt (endógena) únicamente como survivina. En la figura 10 se presentan los resultados de la inhibición de hnRNP H1 y el efecto que esta tiene sobre la expresión de ARN mensajero de Survivina en la línea celular HeLa. En la figura 10A podemos observar que la expresión de survivina disminuye al inhibir la síntesis del ARNm de hnRNP H1 el cual disminuye 37.7 % (figura 10) a la derecha se observa la gráfica de barras que corresponde al promedio de los 3 experimentos el cual fue de  $28.2 \pm 8.8$  % para survivina y  $15.7$  % para hnRNP H1 y  $14.9 \pm 4.0$  % como promedio. Estos resultados sugieren un posible efecto de hnRNP H1 sobre la



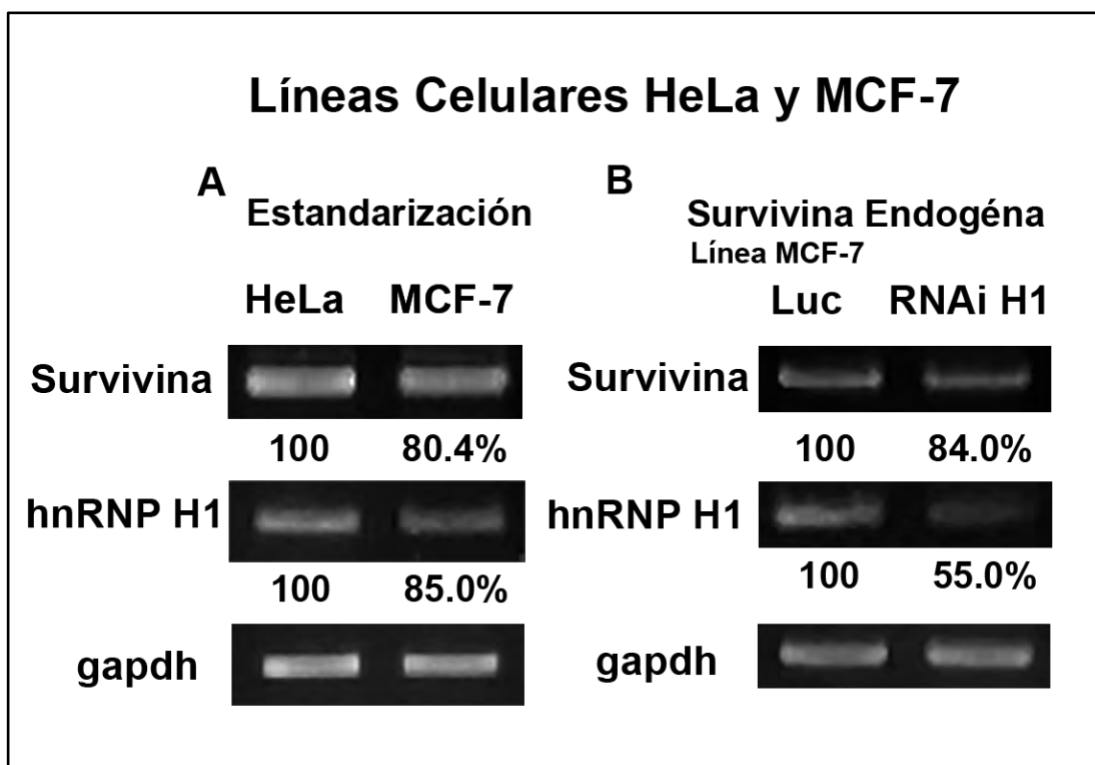
expresión de ARN mensajero de Survivina, pero los cambios observados no son lo suficientemente grandes para ser significativos.

Con la finalidad de verificar si la disminución en la expresión de la survivina es significativa, se optó por realizar PCR en tiempo real (figura 10B). Con este experimento, podemos observar que la expresión de la survivina disminuye 16.7 %. Estos resultados se analizaron utilizando la prueba estadística *t-student* y se determinó que no existe una diferencia significativa de la expresión de survivina al compararla con el control. Aunque se observa que la expresión de la survivina posee una tendencia a disminuir cuando inhibimos la síntesis de hnRNP H1. Cabe mencionar que las células empleadas en estos experimentos fueron sometidas a trasfecciones transitorias de 48 h, tanto en la PCR semi-cuantitativa como en la PCR-Tiempo Real. También se evaluó la expresión de las isoformas: survivina DEX3 y survivina 2B, los resultados se presentan en la figura 11, los experimentos se realizaron por duplicado y se encontró que ambas isoformas; survivina DEX3 y survivina 2B, no presentan un cambio en su expresión en presencia del ARNi H1; ya que su expresión fue de  $97.3 \pm 4.0$  % y  $99.9 \pm 0.7$  % respectivamente.



*Figura 11-* Inhibición del ARN mensajero de hnRNP H1 y el efecto en la expresión de las isoformas Survivina DEX3 y survivina 2B en la línea celular HeLa. **A** PCR semi-cuantitativo de células HeLa transfectadas con el ARNi hnRNP H1 y la expresión de la isoforma survivina DEX3 (Se muestra el porcentaje de expresión de cada uno de los ARNm (n=3)). **B** PCR semi-cuantitativo de células HeLa transfectadas con el ARNi hnRNP H1 y la expresión de la isoforma survivina 2B (Se muestra el porcentaje de expresión de cada uno de los ARNm) (n=2). En todos los experimentos se empleó gapdh como gen constitutivo para normalizar y se llevaron a cabo transfecciones transitorias de 48 h.

Posteriormente, se evaluó el efecto del ARNi H1 sobre la expresión del ARN mensajero de survivina en la línea celular MCF-7. En la figura 12A se muestra la estandarización de la expresión basal de los genes survivina y hnRNP H1, en la línea celular MCF-7 y se comparó frente a la expresión relativa de los mismos genes en la línea celular HeLa. Los valores obtenidos de expresión para cada gen fueron los siguientes: survivina con 80.4 % y hnRNP H1 con 85.0 %. En el panel B de la misma figura se muestra la determinación de la expresión relativa de survivina endógena de la línea celular MCF-7 al inhibir la síntesis de hnRNP H1 y se obtuvo una expresión para survivina endógena de: 84.0 % y la expresión de hnRNP H1 fue 55.0 %.



*Figura 12-* Estandarización y cuantificación de la expresión de la survivina en células HeLa y MCF-7. **A** PCR semi-cuantitativo de la expresión basal de survivina y hnRNP H1, en la línea celular MCF-7 y HeLa (n=1). **B** PCR semi-cuantitativo de las células MCF-7 trasfectadas con el ARN de interferencia de hnRNP H1 y la expresión de la survivina endógena (Se muestra el porcentaje de expresión de cada una de los ARN mensajeros). En los todos los experimentos se empleó Gapdh como gen constitutivo para normalizar y se llevaron a cabo trasfecciones transitorias de 48 h.

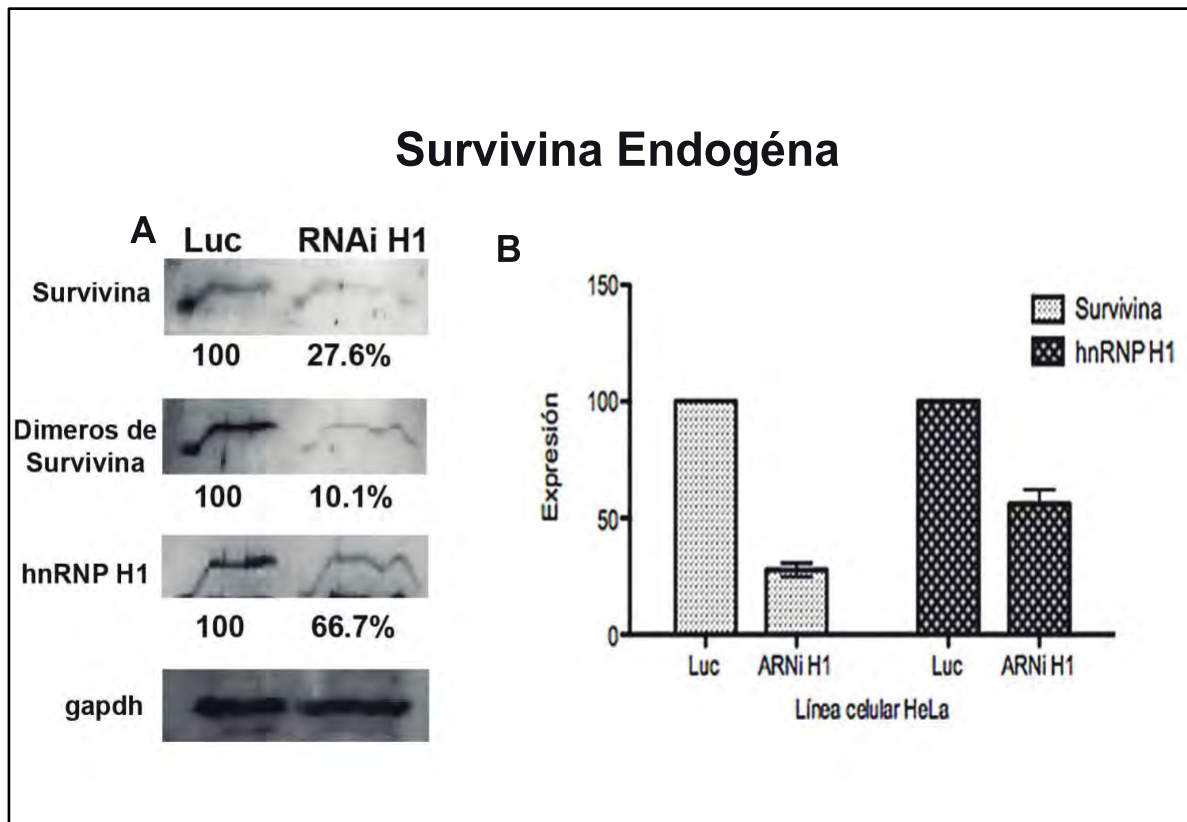




### *Análisis*

Los resultados mostrados en la figura 10A sugieren un posible efecto de inhibición de hnRNP H1 sobre la expresión de ARN mensajero de Survivina parecidos a los resultados obtenidos en los experimentos de los antecedentes experimentales, pero no son lo suficientemente grandes para determinar el efecto. Por lo cual se complementaron con una técnica más cuantitativa; PCR-Tiempo Real (figura 10B), al efectuar el análisis estadístico se determinó que no existe una diferencia significativa de la expresión de survivina al compararla con el control, por lo cual únicamente podemos decir que existe una tendencia a disminuir del ARN mensajero de survivina, aunque faltaría realizar nuevos ensayos para validar esto. También se evaluó la expresión de las isoformas survivina DEX3 y survivina 2B; isoformas que se eligieron ya que son las que se expresan en mayor medida junto con la survivina wt, además de ser isoformas representativas con características pro-apoptóticas “survivina 2B” y anti-apoptóticas “survivina DEX3” (*Khan y Ferguson 2014*). Los resultados se presentan en la figura 11 donde se observa que no hay cambio en la expresión de ninguna de las dos isoformas, por lo cual la inhibición de hnRNP H1 no afecta la regulación del ARNm de ninguna de sus isoformas. Finalmente, se evaluó el efecto del ARNi H1 sobre la expresión del ARN mensajero de survivina en la línea celular MCF-7, para así comprobar que los resultados observados se debieran a la interacción general de la proteína hnRNP H1 con el ARNm de survivina, y no a causa de alguna característica propia de la línea celular empleada, en este caso HeLa. Para ello, primero se estandarizó la expresión basal de los genes survivina y hnRNP H1 en la línea celular MCF-7 (figura 12A); los resultados obtenidos muestran que la expresión basal de los genes survivina y hnRNP H1 es menor en la línea celular MCF-7 que en HeLa. Posteriormente se llevó a cabo la determinación de survivina endógena al inhibir hnRNP H1 mediante el experimento de RT-PCR semi-cuantitativo, para así determinar si la inhibición de hnRNP H1, modula la expresión de ARNm de Survivina wt en la línea celular MCF-7. Los resultados obtenidos muestran que al igual que en la línea celular HeLa, no existe diferencia significativa, pero si se observa una tendencia a disminuir la expresión de survivina cuando inhibimos hnRNP H1.

**Apartado 2-** Determinación del efecto de inhibición de hnRNP H1, en la expresión a nivel de proteína de: Survivina, survivina DEX3 y survivina 2B; en la línea celular HeLa.



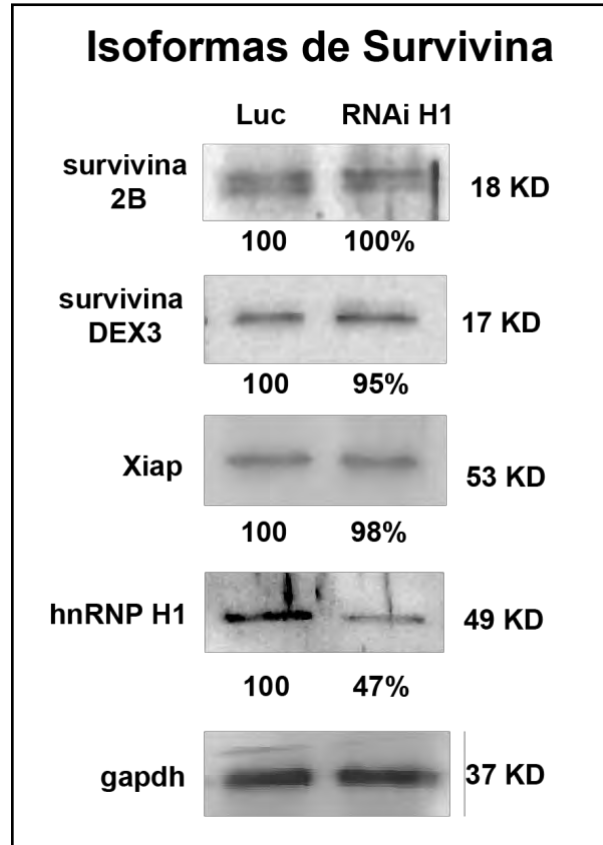
*Figura 13-* Efecto de la inhibición de hnRNP H1 en la expresión de la proteína de la Survivina Endógena en la línea celular HeLa. **A** Western blot de células HeLa trasfectadas con el ARNi de hnRNP H1 y la expresión de la proteína de la survivina endógena, se muestra el porcentaje de expresión de cada una de las proteínas. **B** Gráfica de barras de la expresión relativa de la survivina endógena ( $n=3$ )  $p<0.005$ , media  $\pm$ DS. En los experimentos se empleó gapdh como gen constitutivo para normalizar y se llevaron a cabo trasfecciones transitorias de 48 h.

Para determinar el efecto en la expresión de la proteína de survivina cuando inhibimos hnRNP H1 (figura 13), se realizó un western blot, se emplearon trasfecciones transitorias de 48 h en la línea celular HeLa. En la figura 13A se presentan imágenes representativas de los experimentos efectuados, donde la expresión de survivina es 27.6 %, al inhibir hnRNP H1 con el ARNi H1 con respecto al control Luc, mientras que la proteína hnRNP H1 tiene una expresión de 66.7 %. En el panel B se muestra la gráfica de barras de la expresión promedio de los triplicados experimentales, las



cuales tuvieron los siguientes valores:  $27.71 \pm 4.9$  % para survivina y  $66.7 \pm 10.6$  % para hnRNP H1. Empleando para los experimentos gapdh para la normalización.

Además, se evaluó la expresión de las isoformas survivina DEX3 y survivina 2B (figura 14); así como de la proteína Xiap, con la finalidad de observar si la proteína hnRNP H1 tiene algún efecto sobre algún otro miembro de la familia de las IAPs. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: para la survivina 2B la expresión fue de 100 %, la isoforma survivina DEX3 fue de 95 % y para Xiap fue de 98 %; mientras que hnRNP H1 se expresaba en 47 %.



*Figura 14-* Efecto de la inhibición de hnRNP H1 en la expresión de las proteínas: survivina 2B, Survivina DEX3B y Xiap (n=1). Durante la normalización se empleó gapdh como gen constitutivo y se realizaron trasfecciones transitorias de 48 h.



### *Análisis*

Además de la determinación del efecto de inhibición de hnRNP H1, en la expresión de ARNm de Survivina mostrados previamente, donde se observó que la proteína hnRNP H1 no está regulando el ARN mensajero de survivina, también se evaluó el efecto de hnRNP H1 a nivel de proteína de survivina cuyos resultados se muestran en las figuras 13 y 14. En estos últimos ensayos se observó que la proteína de survivina disminuye 72.4% cuando las células son transfectadas con el ARNi H1 (figura 13B). Estos resultados sugieren que la proteína hnRNP H1 podría estar participando de forma importante en la regulación de la expresión de survivina a nivel de proteína, aunque es necesario realizar más ensayos para validar dicha hipótesis.

La producción y el mantenimiento de las proteínas implica un gran número de procesos, los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: los procesos pre-traducción; los cuales engloban todos los procesos involucrados con el procesamiento del ARN mensajero y que van desde la transcripción, transporte y la degradación del ARN mensajero y los involucrados con la traducción de las proteínas que son aquellos que abarcan la síntesis proteica en sus tres pasos: iniciación, elongación y terminación; así como la localización, modificación y destrucción de las proteínas (*Vogel y Edward, 2012*). Así, para determinar el tipo de interacción en la cual está participando hnRNP H1 sobre la síntesis proteica de survivina, es necesario realizar pruebas que abarquen el segundo grupo de mecanismos involucrados con el procesamiento de las proteínas; ya que como se presenta en el apartado número uno, la inhibición de hnRNP H1 no afecta la expresión a nivel de ARN mensajero de survivina ni de las isoformas survivina DEX3 y survivina 2B; los experimentos necesarios para determinar el tipo de interacción a nivel de proteína forman parte de una etapa diferente a este proyecto, por lo que quedan a disposición de experimentos futuros. Cabe mencionar que únicamente se determinó el efecto a nivel de proteína en la línea celular HeLa y no se evaluó en la línea celular MCF-7.

También se evaluó si el efecto de la inhibición de la proteína hnRNP H1 era exclusivo de la survivina wt por lo cual se determinó la expresión de las isoformas survivina

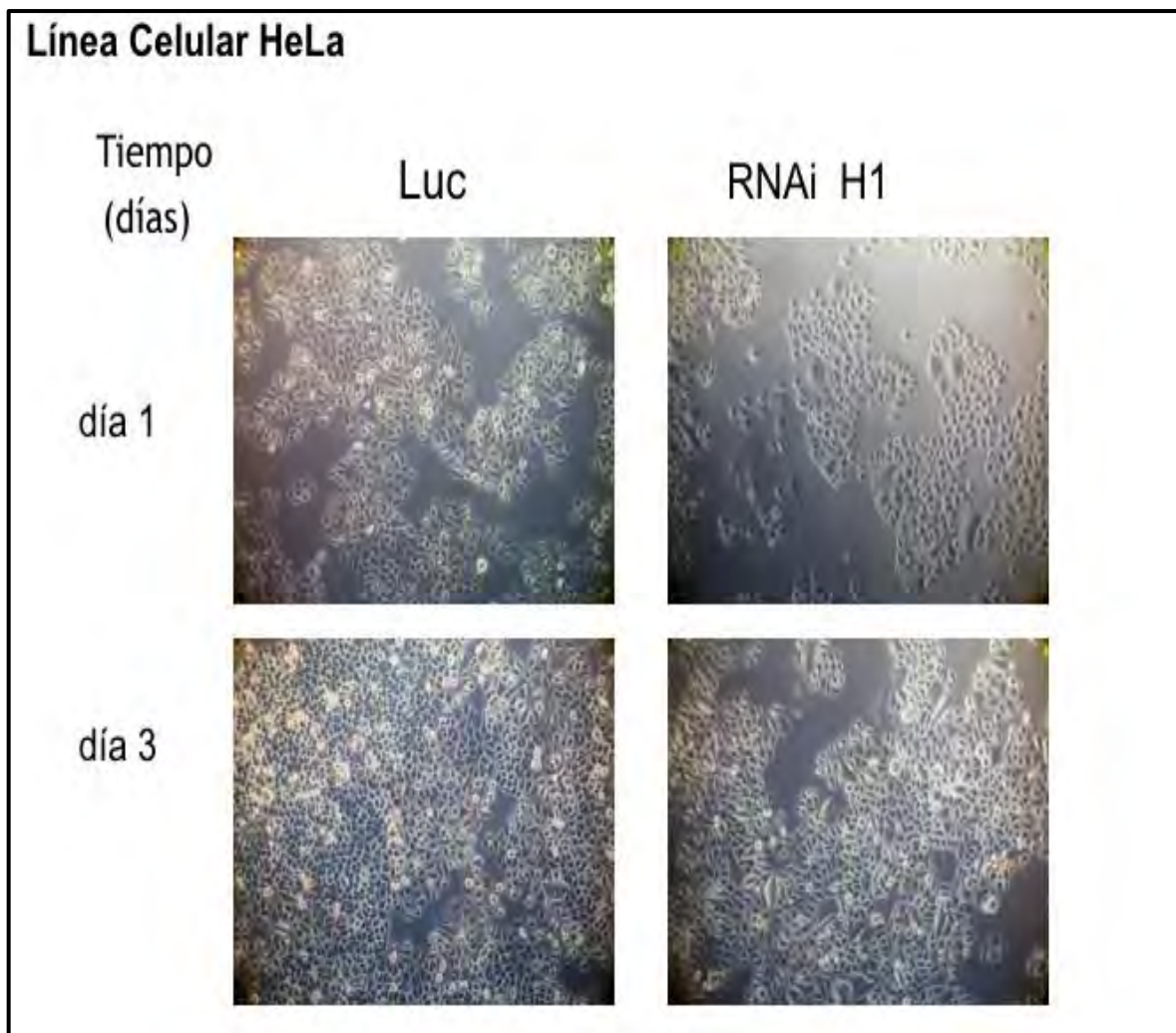


DEX3 y survivina 2B, así como de la proteína Xiap (figura 14), esta última con la finalidad de observar si la proteína hnRNP H1 tiene algún efecto sobre algún otro miembro de la familia IAPs. Xiap se eligió dado a que es uno de los miembros más representativos y con mayor interacción en la inhibición del proceso de apoptosis. Con base en los resultados anteriores, donde se aprecia que no hay cambio en los niveles de expresión a nivel de proteína en ninguna de las dos isoformas de survivina DEX3 y 2B; así como tampoco en la proteína Xiap en presencia del RNAi H1, se puede asumir que la proteína hnRNP H1 no tiene ningún efecto sobre expresión a nivel de proteína de ninguna de las isoformas, ni sobre la proteína Xiap.



## *Ensayos funcionales en las líneas celulares HeLa y MCF7, ambas líneas con expresión estable del ARNi hnRNP H1*

Para determinar si las trasfecciones con el ARNi H1 afectaban de alguna manera el crecimiento celular se efectuaron trasfecciones estables de la línea celular HeLa (figura 15) y de la línea celular MCF-7 (figura 16). Se observó que, al poner a crecer ambas líneas, hubo una drástica diferencia en cuanto al crecimiento ya que las células transfectadas con el ARNi H1 en ambas líneas celulares HeLa y MCF-7, tardaban más tiempo en crecer en comparación con el control. Por esta razón se decidió sembrar un número conocido de células, tanto del control como de la línea celular transfectada con el ARNi de interferencia esto para cada línea celular. Se sembraron 180,000 células de la línea HeLa estable tanto para el control como del ARNi y posteriormente se observó el crecimiento de ambas durante 4 días y se tomaron imágenes representativas en los días 1 y 3 (figura 15), que fueron los días donde se apreciaban los cambios en la línea con el ARNi H1 con respecto al control. En cuanto a la línea MCF-7 se sembraron 200,000 células y el periodo de observación fue de 5 días, tiempo necesario para llegar a la máxima capacidad de la caja cultivo, que es menor que HeLa dado que esta línea tiene una tasa de crecimiento menor. Las imágenes representativas se tomaron del día 1, 3 y 5 (figura 16), días donde se observaron cambios.



*Figura 15-* Crecimiento Celular en la línea HeLa. Crecimiento celular observado en los días 1 y 3, empleando trasfecciones estables con el ARNi H1.

Como se puede observar en la figura 15, las células HeLa que contenían integrado el ARNi H1 crecían lento en comparación con el control Luc. En cuanto a la línea celular MCF-7 (figura 16), la diferencia en el crecimiento con el ARNi H1, es más notoria con respecto al control Luc, que en la línea celular HeLa. Esto se debe a que la línea celular MCF-7 presenta divisiones celulares más lentas que la línea HeLa, por lo que se pudo apreciar mejor la diferencia. En la imagen se puede ver que la confluencia en la caja control Luc en el día 5 es de 100 % mientras que la de la caja con el ARNi H1 es menor al 50 % aproximadamente (figura 16).



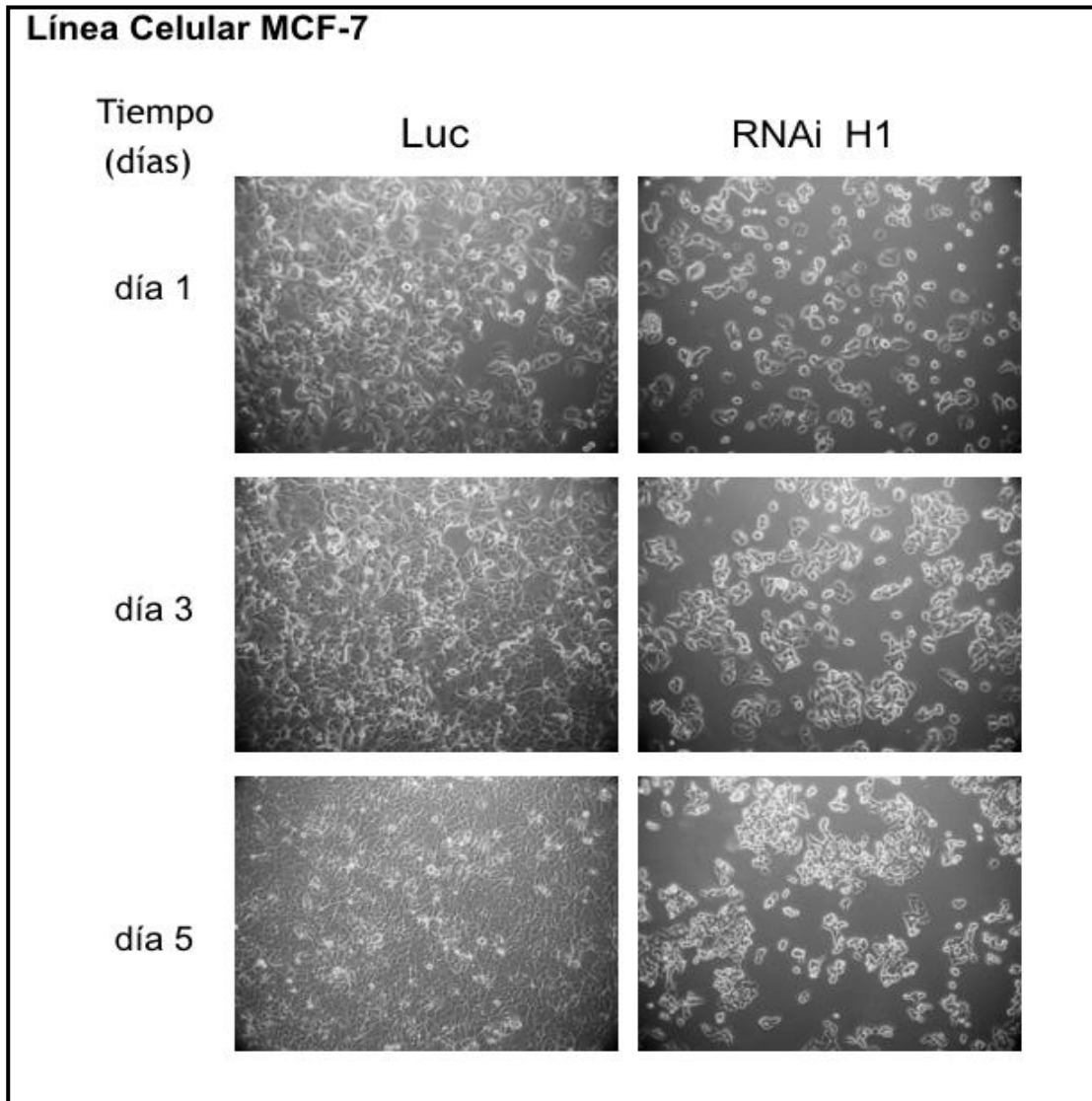


Figura 16- Proliferación Celular en la línea celular MCF-7. Evaluado a los días: 1,3 y 5; empleando trasfecciones estables con el ARNi H1.

Los resultados anteriores nos muestran, de manera general, el efecto de la proteína hnRNP H1 sobre el crecimiento celular, debido a que en ambas líneas se ven afectadas. Con base en los resultados anteriores, se puede presumir que la inhibición de hnRNP H1, afecta la expresión de la proteína survivina, por lo cual el crecimiento celular disminuye dado que, como se mencionó anteriormente, la survivina participa de forma importante en la división celular (Selvaraj y Fang, 2013) alterando, de esta forma, la cantidad de células que se producen. Sin embargo, se deben realizar otras pruebas para verificar lo antes descrito.

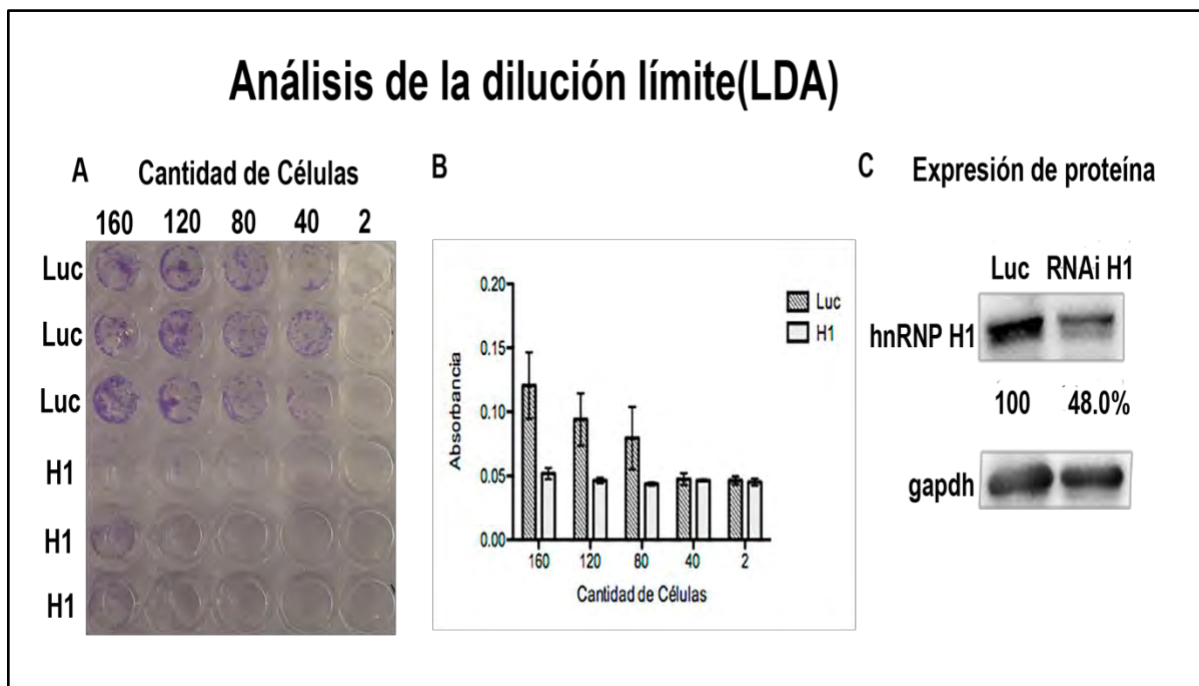


**Apartado 3-** Evaluación del efecto de inhibición de la proteína hnRNP H1 sobre el crecimiento celular en la línea HeLa, mediante el ensayo LDA.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la inhibición de hnRNP H1 sobre el crecimiento celular, y su posible papel en la regulación de la expresión de la survivina, se llevó a cabo el ensayo LDA por sus siglas en inglés “*Limiting dilution analysis*” (Análisis de la dilución límite). Un ensayo de dilución limitante es una técnica experimental que sirve para cuantificar la proporción de partículas biológicamente activas (células) en una población, los dos principales requisitos para esta técnica consisten en tener cultivos independientes y que la frecuencia de partículas biológicamente activas sea constante (*Hu y Gordon, 2009*), para ello, se realizan replicas que varían en el número de partículas activas analizadas, en nuestro caso el número de células; se efectúan diluciones sucesivas de estas, continuándolas hasta la extinción de la respuesta o cerca de ella. De esta manera la tasa de respuestas positivas y negativas a cada dosis permite inferir la frecuencia de las partículas biológicamente activas (*Hu y Gordon, 2009*).

En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos del ensayo anterior, el cual se llevó a cabo en la línea celular HeLa, empleando transfecciones estables con el ARNi para hnRNP H1. En la figura 17A se muestra una imagen representativa del ensayo LDA, las columnas representan la cantidad de células presentes por dilución, las cuales fueron: 160, 120, 80, 40 y 2, mientras que las filas corresponden a las réplicas experimentales, donde las filas nombradas como Luc pertenecen al control y las filas nombradas como H1 pertenecen a la línea celular estable para el ARNi H1. Para determinar la cantidad de células presentes por pozo se midió la absorbancia transcurridos siete días (figura 17B).

Para efectuar la determinación de la absorbancia fue necesario fijar y teñir las células utilizando cristal violeta, resultado que se presenta en la figura 17A; ya que esta técnica permitió efectuar una mejor lectura, también ayudó a la eliminación de los factores pertenecientes al medio de cultivo que impedían la observación, además el colorante con el que fueron teñidas evitó la refracción de la luz, lo que permitió una buena visibilidad. Posteriormente se midió la absorbancia (figura 17B), para ello fue necesario extraer el colorante de las células después de ser teñidas, mediante la utilización del ácido acético. Se efectuó esta determinación, debido a que la lectura de la absorbancia, está directamente relacionada con el número de células de células presentes por pozo.



**Figura 17-** Análisis de la dilución límite “Limiting Dilution Analysis” (LDA) Trasfecciones estables, línea celular HeLa. **A** placa representativa del experimento LDA (n=3), donde las filas Luc, corresponden al control y las filas H1 corresponden a la línea con el ARNi H1, las columnas corresponden a la cantidad de células sembradas, **B** Promedio de la cuantificación de la absorbancia de la placa (n=3); **C** Western blot de la línea estable HeLa para el control (Luc) y el ARNi H1, se utilizó como proteína constitutiva gapdh.

Finalmente, en el panel 17C se presenta el western blot de la proteína hnRNP H1 en la línea celular HeLa estable con el ARNi H1, en ésta se puede observar la disminución del 52% de la proteína hnRNP H1 con el ARNi H1 en comparación con el control Luc.



### *Análisis*

El ensayo de análisis de la dilución límite se emplea en varias determinaciones en las que destaca la cuantificación de bacterias, de células inmunocompetentes, de células madre y es muy común su uso en inmunología para el estudio de células T y células B y las interacciones de ambas (*Bonnefoix y Philippe, 1996; Hu y Gordon, 2009*). En este trabajo, se empleó para determinar de forma cuantitativa la proliferación celular después de someter a la línea celular HeLa a la trasfección estable con el ARNi de hnRNP H1 frente a un control Luc, también se efectuó el conteo en el número de formación de colonias, este último, con poco éxito ya que no se pudo realizar un conteo exacto en la formación de colonias, debido a la interferencia ocasionada por partículas pertenecientes al medio de cultivo y a los restos celulares que no podían eliminarse con los lavados. Además, el reducido tamaño de los pozos de la placa de cultivo, las células y el color del medio de cultivo refringía la luz del microscopio impidiendo una buena observación, lo que dio como resultado una gran variabilidad en los datos, generando resultados poco confiables, por esta razón se optó por obtener la absorbancia de cada pozo.

En el panel B de la figura 17, se presenta los resultados del promedio de las absorbancias, en ésta se puede observar una notoria disminución en la cantidad de células presentes en los pozos con las diluciones mayores (160, 120, 80) en las filas H1, donde se aprecia que la absorbancia obtenida para éstas es aproximadamente la mitad de la absorbancia obtenida en el control Luc. Mientras que en las últimas dos diluciones (40 y 2), presentan similar absorbancia tanto en el control como en H1; resultados que no corresponden con lo observado al teñir las colonias ya que en la dilución 40 se obtuvo una clara diferencia entre Luc y H1 (figura 17A), este último resultado se debió posiblemente a que el equipo ya no tenía la sensibilidad para detectar dicha medición al ser muy pequeña.



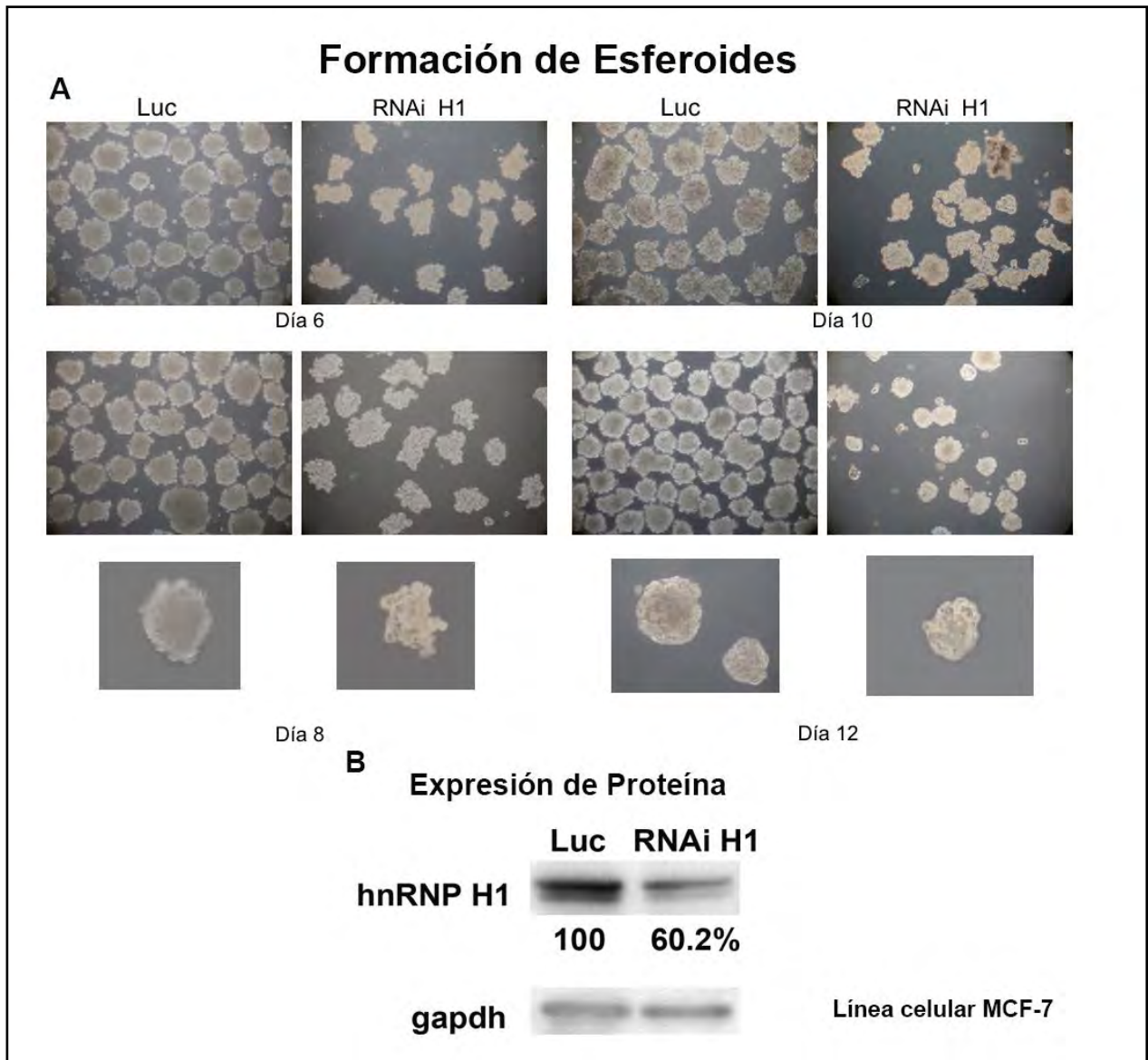
**Apartado 5-**. Evaluación del efecto de la inhibición de la proteína hnRNP H1 en la formación de esferoides en la línea celular MCF-7.

Para la evaluación del efecto de la inhibición de hnRNP H1 sobre la proliferación celular en la línea MCF-7 se llevaron a cabo cultivos de esferoides, ya que este modelo permite el estudio a pequeña escala de las condiciones reales de un tumor in vivo con una mayor exactitud que los cultivos tradicionales.

En la figura 18 se presentan imágenes representativas de la formación de esferoides, el cual se llevó a cabo en la línea celular MCF-7, empleando trasfecciones estables con el ARNi H1 y el control Luc. El experimento consistió en sembrar 1 000 000 células tanto del control como con de las células con el ARNi H1, para después ser sometidas a las condiciones descritas en material y métodos. Una vez en las condiciones descritas, se fue monitoreando la formación de los esferoides.

Se tomaron imágenes representativas del crecimiento de los esferoides (figura 18), a los días: 6, 8, 10 y 12; que fueron los días donde se observaron diferencias evidentes en la formación de los esferoides al inhibir hnRNP H1 con respecto al control Luc. Así pues, a partir del día 6 se obtuvieron esferoides definidos en Luc, con respecto al ARNi H1 donde solo se presentan agregados. Es necesario mencionar que como parte de la técnica de cultivo se retiraban las células aisladas que no formaban esferoides ni agregados, ya que la presencia de estas células genera estrés para las células en formación del esferoide.

En cuanto a los días 8 y 10 la formación de los esferoides es más clara en el control (figura 18), ya que en la imagen se pueden apreciar el contorno de los esferoides más definidos, además de que se comienzan a definir las zonas características de los esferoides. Por último, para comprobar la disminución de la proteína hnRNP H1 en la línea celular MCF-7 en las trasfecciones estables, se llevó a cabo un western blot (figura 18B), donde se obtuvo que la expresión de proteína hnRNP H1 es de 60.2% usando para la estandarización gapdh como gen constitutivo.



*Figura 18-* Formación de Esferoides en la línea celular MCF-7. **A** Curso temporal de la formación de esferoides, día 1, 6, 8, 10, y 12. **B** Western Blot de la proteína hnRNP H1 de células MCF-7 estables con el ARN de interferencia contra hnRNP H1.

### Análisis

Para la determinación del efecto de inhibición de hnRNP H1 sobre la proliferación celular en la línea celular MCF-7 se llevaron a cabo cultivos de esferoides, se optó por esta técnica, debido a que se ha observado que la línea celular MCF-7 es capaz de formar esferoides en casi todas las condiciones de cultivo en 3D conocidas; incluyendo el método de suspensión empleado en este trabajo, el cual es un método relativamente sencillo, económico y permite la posibilidad de aumentar la producción de esferoides (*Froehlich y Haeger, 2016*). Los modelos de cultivo en 3D como los esferoides, son un modelo potencial para el estudio de la biología celular y de la investigación del cáncer. Su aplicación ha aumentado en los últimos años, ya que este tipo de modelos asemeja en gran medida las condiciones de los tumores in vivo en comparación a los cultivos convencionales en 2D que son más limitados (*Pampaloni y Emmanuel, 2007*). Además, se ha reportado que en la formación de los esferoides se expresan niveles altos de una gran diversidad de proteínas entre las que se encuentran: proteínas metabólicas, de respuesta-estrés celular, estructurales, de transducción de señales y proteínas de transporte celular (*Nath y Gayathri, 2016*).

En la figura 18 podemos observar la formación y el crecimiento de los esferoides en los cultivos del control Luc con respecto a los cultivos con el ARNi H1 donde no se observó dicha tendencia, ya que a partir del día 6 se comenzó a observar la formación de los esferoides en el cultivo del control para el día 10 la formación de los esferoides era más evidente ya que se aprecia el contorno de los esferoides más definidos, además de que se comienzan a definir las zonas características de los esferoides. La cual se divide en tres: la zona más externa se caracteriza por contener en su estructura células en proliferación, la segunda zona está conformada por un área hipóxica interna con células quiescentes y por último la parte más interna un núcleo necrótico (*Froehlich y Haeger, 2016*). Finalmente, en el día 12 en Luc se observan esferoides bien definidos de mayor tamaño, además se percibe con claridad el centro necrótico (figura 19A); mientras que en la línea transfectada con el ARNi H1 solo se observaron agregados celulares pequeños y deformes. En cuanto al tamaño de los esferoides obtenidos en el ensayo, estos presentan distintos tamaños (figura 18A),



ocasionados por el método de obtención empleado” suspensión” (*Pampaloni y Emmanuel, 2007*). el tamaño de los esferoides maduros aproximado reportado con el método de suspensión es de 100 a 200  $\mu\text{m}$  (*Froehlich y Haeger, 2016*).

Una posible explicación por la que no se están formando los esferoides en la línea con el ARNi H1, es la alteración de los ciclos de división celular, como se mencionó previamente la zona más externa de los esferoides se caracteriza por tener células en proliferación constante. Al inhibir hnRNP H1 disminuye la cantidad de survivina, proteína importante en el proceso de división celular (*Selvaraj y Fang, 2013*). Afectando directamente la formación de los esferoides, pero sería necesario complementar con otros experimentos dicha suposición.





## Conclusiones

1.- La inhibición de hnRNP H1, aunque presenta tendencia a disminuir, no afecta la expresión del ARN mensajero de survivina, así como tampoco la expresión del ARN mensajero de las isoformas survivina DEX3 y survivina 2B. Además, dicho comportamiento no es exclusivo de una sola línea celular; ya que tanto la línea celular HeLa como en MFC-7 se observa el mismo comportamiento.

2.- La expresión a nivel de proteína de la survivina wt, disminuye al inhibir hnRNP H1; pero no se modifica la expresión de las isoformas survivina DEX3, survivina 2B y tampoco de la proteína Xiap. Por lo cual, hnRNP H1 participa de forma importante únicamente en la regulación de la survivina wt; cuyo mecanismo deberá ser determinado en ensayos posteriores.

3.- La inhibición de hnRNP H1 afecta el crecimiento celular en la línea celular HeLa, ya que las líneas con trasfecciones estables con el ARNi H1, presentan menor crecimiento celular. El mecanismo por el cual se está llevando este proceso aun no es conocido, pero es posible que se lleve mediante la interacción hnRNP H1 con la survivina, por lo cual, para validar esto se necesitan ensayos complementarios.

4.- La inhibición de la proteína hnRNP H1, afecta la formación de esferoides en la línea celular MCF-7; ya que las líneas con trasfecciones estables con el ARNi H1, no formaban esferoides.



De manera general; hnRNP H1 participa en la regulación a nivel de proteína de survivina a través de mecanismos independientes a la regulación a nivel de ARN mensajero, interacción que deberá ser estudiada más adelante mediante experimentos relacionados a nivel de síntesis proteica. Por otro lado, esta participación modifica el crecimiento celular en el caso de la línea celular HeLa y la formación de esferoides en la línea celular MCF-7. Los mecanismos por los que se llevan a cabo éstas interacciones son desconocidas, por lo que sería necesario realizar más experimentos.

## **Expectativas**

- 1.-Incrementar la inhibición del ARN mensajero de hnRNP H1 a través del diseño de nuevos ARN de interferencia, con el fin de evaluar nuevamente si la inhibición de hnRNP H1 y si esta afecta los niveles de ARN mensajero de la survivina.
- 2.-Complementar los resultados obtenidos, mediante la sobreexpresión de hnRNP H1, y evaluar el efecto ensayos de apoptosis y clonogenicidad en las líneas celulares HeLa y MCF-7.
- 3.-Determinar si la proteína de hnRNP H1 puede formar un complejo con el ARNm de la survivina y de esta forma evaluar si tiene una participación directa o no en la regulación de la expresión de la proteína de survivina.



## Referencias

- Altieri, D. (2008). "New wirings in the survivin networks". *Nature oncogene*. Vol. 27. Pag 6276–6284.
- Bonnefoix, T. Bonnefoix, P. Otros. (1996). "Fitting limiting dilution experiments with generalized linear models results in a test of the single-hit Poisson assumption". *El Sevier*. Vol.194. Pag. 113- 119.
- Budhidarmo, R. Day, C. (2014). IAPs: "Modular regulators of cell signalling". *Cell and Developmental Biology*. Vol 39. Pag 80-90.
- Caldas, H. Jiang, Y. (2005). "Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death". *Oncogene*. Vol. 24. Pag1994-2007.
- Chen, Q. Jin, M. Otros. (2013). "Functions of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins in Stem Cell Potency and Differentiation". *Biomed Res Int*. Vol.2013. Pag 1-12.
- Dario, C. Altieri, D. (2008). "Survivin, Cancer networks and pathway-directed drug discovery". *Nature Reviews*. Vol. 8. Pag 61-68.
- Dario, C. Altieri, D. (2010). "Survivin and IAP proteins in cell death mechanisms". *Biochem J*. Vol. 430. Pag 199-205.
- Evans, A. Brice, G. Otros. (1999). "Mapping of Primary Congenital Lymphedema to the 5q35.3 Region". *AJHG*. Vol. 64. Pag 547-555.
- Froehlich, K. Haeger, K. Otros. (2016). "Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols". *Springer, J Mammary Gland Biol Neoplasia*. Vol. 21. Pag 89–98.



- Garrison, J. Chunmin, G. Otros. (2015). “Knockdown of the Inhibitor of Apoptosis BRUCE Sensitizes Resistant Breast Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents”. *J Cancer Sci Ther*. Pag 121-126.
- Gaytán, J. González, C. Otros. (2017). “Protein Sam68 regulates the alternative splicing of survivin DEx3”. *JBC Articles*. Vol. 292. Pag 13745-13757.
- Geuens, T. Bouhy, D. Otros. (2016). “The hnRNP family: insights into their role in health and disease”. *Springer Hum Genet*. Vol.135. Pag 851–867.
- Globocan (2 de Marzo de 2016). Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21262/full>
- Hanahan, D. Y Weinberg, R. (2000). “The Hallmarks of Cancer”. *Cell Press*. Vol. 100. Pag. 57-70.
- Hanahan, D. Y Weinberg, R. (2011). “*Hallmarks of Cancer: The Next Generation*”. *Cell Press*. Vol. 144. Pag. 646-674.
- Hartanto C. Zhang, H. (2017). “Advances in multicellular spheroids formation”. *J R Soc Interface*. Vol.14. Pag 1-15.
- Hassan, M. Watari, H. Otros. (2014). “Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer”. *BioMed Research International*. Vol. 2014. Pag 1-23.
- hnRNP H1 (21 de marzo de 2016). Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3187>
- Hu, Y. Smyth, G. (2009). “ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays”. *El Sevier*. Vol. 347. Pag 70–78.



- Huelga, S. Vu, A. Otros. (2012). “Integrative Genome-wide Analysis Reveals Cooperative Regulation of Alternative Splicing by hnRNP Proteins”. *Cell Reports*. Vol. 1. Pag 167–178.
- INEGI (2 de Marzo de 2016). Recuperado de <http://www.inegi.org.mx>
- Khan, S. Ferguson, H. Otros. (2014). “Early Diagnostic Value of survivin and its alternative splicing variants in breast cancer”. *BMC Cancer*. Vol.14. Pag 2407-1414.
- Kim, D. Langlois, M. Otros. (2005). “HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal Branch point sequence”. *Nucleic Acids Research*. Vol. 33. Pag 3866-3874.
- Krecic, A. Swanson, M. (1990). “hnRNP complexes: composition, structure, and function”. *El sevier*. Vol. 11. Pag 363-371.
- Krieg, A. Baseras, B. Otros. (2013). “Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric cancer: a meta-analysis”. *Molecular Biology Reports*. Vol. 40. Pag 5501–5511.
- Martínez, M. Morán, J. Maldonado, V. Otros. (2004). “SMAC/DIABLO y su papel en la regulación de la apoptosis”. *UNAM Reb*. Vol.23. Pag 64-70.
- Mauger, D. Lin, C. Otros (2008). “hnRNP H and hnRNP F Complex with Fox2 to silence fibroblast Growth factor receptor 2 exon IIIc”. *Molecular and cellular biology*. Vol.17. Pag 5403–5419.
- Mauger, D. Lin, C. Otros. (2008). “hnRNP H and hnRNP F Complex with Fox2 To Silence Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Exon IIIc”. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 28. Pag 5403–5419.



- Mauger, D. Lin, C. Otros. (2008). “hnRNP H and hnRNP F Complex with Fox2 To Silence Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Exon IIIc”. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 28. Pag 5403–5419.
- Mita, A. Mita, M. Otros. (2008). “Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics”. *Clin Cancer Res*. Vol.14. Pag 5000-5005.
- Mobahat, M. Narendran, A. (2014). “Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy”. *Int J Mol Sci*. Vol.15. Pag 2495-2516.
- Nath, S. Devi, G. (2016). “Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model”. *El Sevier, Pharmacology & Therapeutics*. Vol.163. Pag 94–108.
- NCBI (3 de Marzo de 2016). Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/332>.
- Noton, E. Cinaghi, R. Otros. (2005). “Molecular analysis of survivin isoforms”. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 281. Pag 1286-1295.
- Ouyang, L. y Shi, Z. Otros. (2012). “Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis”. *Cell Proliferation*. Vol. 45. Pag 487-498.
- Pampaloni, F. Reynaud E. Otros. (2007). “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue”. *Nature molecular cell-biology*. Vol.8. Pag. 839-844.



- Papanikolaou, V. Lliopoulos, D. Otros. (2011). “Survivin regulation by HER2 through NF- $\kappa$ B and c-myc in irradiated breast cancer cells”. *Cell Mol Med*. Vol 15. Pag 1542-1550.
- Ping, S. Hang, Y. Otros. (2010). “Functional diversity of the hnRNPs: present and perspectives”. *Biochem J*. Vol. 430. Pag 379-392.
- Preston, S. Malcom C. (1990), “Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer”. *Cancer research*. Vol. 50. Pag 7415-7421.
- Saleem, M. Imran, M. Otros. (2013). “Inhibitors of Apoptotic Proteins: New Targets for Anticancer Therapy”. *Chem Biol Drug Des*. Vol. 82. Pag 243–251.
- Selvaraj, M. ying, F. Otros. (2013). “Treat cancers by targeting survivin: Just a dream or future reality?”. *Cancer treatment reviews* Vol.39. Pag 802-811.
- Sharma, S. Kaufmann, T. Otros. (2016). “Impact of inhibitor of apoptosis proteins on immune modulation and inflammation”. *Immunology and Cell Biology*. Vol. 3. Pag 236-243.
- Tipos de transfección (18 de Enero 2017) Recuperado de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/types-of-transfection.html>
- Verhagen, A. Coulson, E. and Vaux, D. (2001). “Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs”. *Genome Biology*. Vol. 2. Pag 1-10.
- Vogel, C. Marcotte, E. (2012). “Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses”. *nature Reviews, genetics*. Vol. 13. Pag 227-232.



- Vogelstein, B. y Papadopoulos, N. (2013). "Cancer Genome Landscapes". *Science*. Vol. 339. Pag.1546-1558.
- Xu, L. Bradley, A. (2013). "The Role of Telomere Biology in Cancer". *Annu Rev Pathol Mech*. Vol. 8. Pag 49–78.