

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Evaluación del efecto pro-apoptótico de la proteína líder de la cápside (LC) de *calicivirus felino* en células tumorales de ovario SKOV3”

## **TESIS**

Que presenta

**QFB. JESÚS ALEJANDRO ESCOBAR ALMAZÁN**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

**en Infectómica y Patogénesis Molecular**

**Directoras de la Tesis**

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano  
Dra. Patricia Talamás Rohana

Ciudad de México.

OCTUBRE, 2019

## ÍNDICE

Abstract .....	1
Resumen .....	2
Antecedentes .....	3
1.0 Cáncer de ovario.....	3
2.0 Tratamiento del cáncer de ovario.....	5
3.0 Proteína survivina como blanco terapéutico del cáncer .....	7
4.0 Los calicivirus como agentes inductores de la degradación de survivina y del establecimiento de apoptosis celular. ....	9
4.1 Biología de <i>Calicivirus felino</i> .....	9
4.2 Apoptosis intrínseca.....	10
4.3. Proteína LC, efecto citopático y apoptosis .....	11
Justificación.....	12
Hipótesis.....	13
Objetivo general .....	14
Objetivos particulares.....	14
Materiales y métodos .....	15
Líneas celulares .....	15
Ensayo de infección .....	15
Propagación de los plásmidos .....	15
Anticuerpos .....	16
Transfección transitoria de LC en CrFK y SKOV3 .....	16
Extractos proteicos totales .....	16
Western blot.....	17
Viabilidad celular .....	17
Análisis morfológico y cuantificación celular .....	17
Resultados .....	19
Inducción del efecto citopático y degradación de survivina en células CrFK infectadas con el FCV.....	19
Niveles de survivina en líneas celulares tumorales y no tumorales .....	21
Propagación de los plásmidos pAmCyan y pAmCyan-LC en bacterias DH5 $\alpha$ ...	22

La expresión de LC en células SKOV3 induce cambios en la morfología celular .....	24
La expresión de LC en células SKOV3 disminuye la viabilidad celular .....	28
La expresión de LC en células SKOV3 induce la degradación de survivina y la activación de caspasa 3.....	29
Discusión.....	32
Conclusión.....	36
Perspectivas.....	36
Referencias .....	37
Abreviaturas .....	45

Este proyecto de maestría se realizó en el laboratorio #9 de virología del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la supervisión y tutoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano<sup>1</sup> y la Dra. Patricia Talamás Rohana<sup>1</sup>, ambas son profesoras e investigadoras titulares de dicho departamento. Además, se contó con la valiosa asesoría de la Dra. Rosa María Del Ángel<sup>1</sup> y Cázares, y el Dr. Alfredo Toledo Leyva<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> Investigador Titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN. Ciudad de México, México.

<sup>2</sup> Investigador del Programa de Cáncer de Ovario, Departamento de Oncología Médica. Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, México.

Un gran agradecimiento al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACYT) por su apoyo, registrado oficialmente el número de convocatoria; 291236 y CVU; 828450. Dicho apoyo fue valioso para la realización de este proyecto de tesis de maestría.

## **Agradecimientos**

Con dedicatoria y agradecimiento a mis padres, Roberto y Elizabeth por ser los principales motores de mi vida y de este proyecto de maestría. Confiando en mi sobre todas las cosas a pesar de las adversidades. Incluyendo a mis hermanos Roberto y Alexis.

A toda mi familia Almazán, porque a pesar de estar distantes siempre me han apoyado.

A mis tíos Carlos y Rocío, sin olvidar a mis primos Carlos, Ana, Vania y José Antonio, por su gran apoyo y comprensión desde antes del inicio este gran proyecto de vida, no sólo académico.

A la Doctora Lorena por confiar en mi capacidad como estudiante de maestría en el desempeño del laboratorio. Además de ser una gran persona con una presencia humilde y decente.

A la Doctora Patricia Talamás por sus grandes sugerencias de este proyecto y por el apoyo en decisiones tomadas para este mismo.

A mis asesores Dra. Rosa María Del Ángel, Dr. Alfredo Toledo y el Dr. Juan Ludert por sus grandes consejos y sugerencias del proyecto.

A la Dra. Clotilde Cancio por su apoyo como auxiliar del laboratorio y guiarme en mis primeros pasos en este laboratorio. Además de proporcionarme todo lo necesario para cumplir los objetivos de esta tesis. Además, su paciencia y tiempo para resolver problemas técnicos.

A José Luis Chavarría Islas por su apoyo técnico, esterilización y lavado de material.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, algunos que ya partieron y están en nuevos proyectos; Óscar, Adrián, Yoatzin, Adriana, Carolina y Mónica.

A mis compañeros de generación; Adrián, Gabriela, Esly, Axel, Carlos, Yoatzin, Juan.

A gente especial que formó parte de este proyecto; Ángel, Celestino, Sebastián, Luis, Gabriela, Esly, Carlos, Noe, Romel, Mercedes, Gerson, Juan y Rocio. Entre otros, debido a que son demasiados.

## **Abstract**

Ovarian cancer has a great impact worldwide; it is estimated that 295,414 new cases occur each year. In Mexico, the incidence of ovarian cancer is 4,759 cases/year with 2,765 deaths (WHO, 2018). Ovarian cancer standard treatment is based on surgery and platinum-based drugs such as cisplatin or carboplatin; however, relapses after treatment are very common. Tumor cells overexpress survivin, an apoptosis inhibitory protein that has an impact in the resistance of antineoplastic drugs, cell death and cell proliferation induction. Our working group has reported that feline calicivirus (FCV) LC protein degrades survivin and X-IAP through proteasome and thus induces apoptosis. Given the above, we propose the FCV LC protein has pro-apoptotic effect and negatively impacts cell viability when expressed in SKOV3 ovarian tumor cells.

## Resumen

El cáncer de ovario es de gran impacto en salud pública a nivel mundial; se estima que cada año ocurren 295,414 nuevos casos. En México, la incidencia del cáncer de ovario es de 4,759 casos al año y 2,765 defunciones (OMS, 2018). El tratamiento del cáncer de ovario se basa en la cirugía y en el uso de fármacos antineoplásicos a base de platino como el cisplatino o el carboplatino; sin embargo, las recaídas posteriores al tratamiento tienden a ser comunes. Las células tumorales sobreexpresan survivina, una proteína inhibidora de la apoptosis, cuyo impacto se relaciona con la resistencia a los fármacos antineoplásicos, a la muerte celular y a la proliferación celular. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la proteína LC de *calicivirus felino* (FCV) degrada survivina y X-IAP a través del proteosoma e induce apoptosis. Tomando en cuenta lo anterior, proponemos que la proteína LC de FCV tiene un efecto pro-apotótico y un impacto negativo en la viabilidad celular al ser expresada en células tumorales de ovario SKOV3.

## **Antecedentes**

### **1.0 Cáncer de ovario**

El cáncer de ovario epitelial (COE) tiene un impacto en salud pública en México y el mundo debido a su alta morbilidad y mortalidad y es considerado el octavo tipo más frecuente, llegando a los 295,414 casos al año en el mundo. En México, ocupa el tercer lugar en incidencia entre los tumores ginecológicos, reportándose 4,759 casos al año, falleciendo 2,765 mujeres a causa de la enfermedad (OMS, 2018). El cáncer de ovario epitelial se subdivide en cinco subtipos principales: 1) seroso papilar de alto grado que comprende a la mayoría de los casos (porcentaje) y se caracteriza por mutaciones en el gen p53. 2) seroso papilar de bajo grado que se caracteriza por ser indolente y presenta mutaciones en los genes PIK3CA, BRAF y KRAS. 3) endometriode, que puede ser de bajo (G1), intermedio (G2) y alto grados (G3). 4) células claras, que es de alto grado y generalmente presenta mutaciones en el gen ARID1A y se asocia a endometriosis. 5) tumores mucinosos, que son de bajo grado, diagnosticados comúnmente en etapas tempranas de la enfermedad; son poco frecuentes pero el 100% de ellos tiene mutación en KRAS (Jayson et al., 2017; de la Garza et al. 2016). La estadificación del cáncer de ovario es proporcionada por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia que tipifica la enfermedad en cuatro etapas (Tabla 1). Del total de los tumores malignos de ovario, el cáncer epitelial ovárico asocia solamente en un 10% con patrón hereditario, ese porcentaje corresponde principalmente a las mutaciones que mencionas adelante, el 90% es atípico y el 10% hereditario para historia familiar de cáncer de ovario o de mama y a la edad (Jayson et al., 2014). El 10% de los tumores en el cáncer de ovario epitelial presentan mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Los estadios tempranos (I y II) presentan dificultades para el diagnóstico, pero cuando es posible detectar el tumor a tiempo, la probabilidad de curación es alta. Los estadios tardíos (III y IV) del cáncer de ovario epitelial representan a la enfermedad avanzada y su pronóstico es desfavorable ya que frecuentemente presentan diseminación a la cavidad peritoneal y a otros órganos. La presencia del líquido ascítico es una característica en el 35% de las pacientes con enfermedad

avanzada siendo más frecuente en EC IIIC. Este fluido representa un microambiente tumoral heterogéneo con altas concentraciones de factores angiogénicos como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) lo que le permite al tumor llegar a órganos vecinos de manera transcelómica (Kobold et al., 2009). Además, se conocen otros factores como el factor de crecimiento fibroblástico beta (FGF- $\beta$ ), IL-8 y el factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) (Rynne-Vidal et al., 2017; Roane et al., 2019) que participan en el microambiente tumoral. Asimismo, se ha descrito que las células presentes en el líquido ascítico o que son cultivadas sufren una transición epitelio-mesénquima y es importante para el microambiente tumoral complejo por la presencia de factores solubles y esta se define como el cambio de fenotipo celular, incluyendo la expresión de factores de crecimiento que inducen la expresión de factores de transcripción como Snail 1, Snail 2, Twist y Zeb1. Todos en conjunto le confieren una mayor capacidad de invasión, metástasis y quimioresistencia a las células tumorales (Deng et al., 2016).

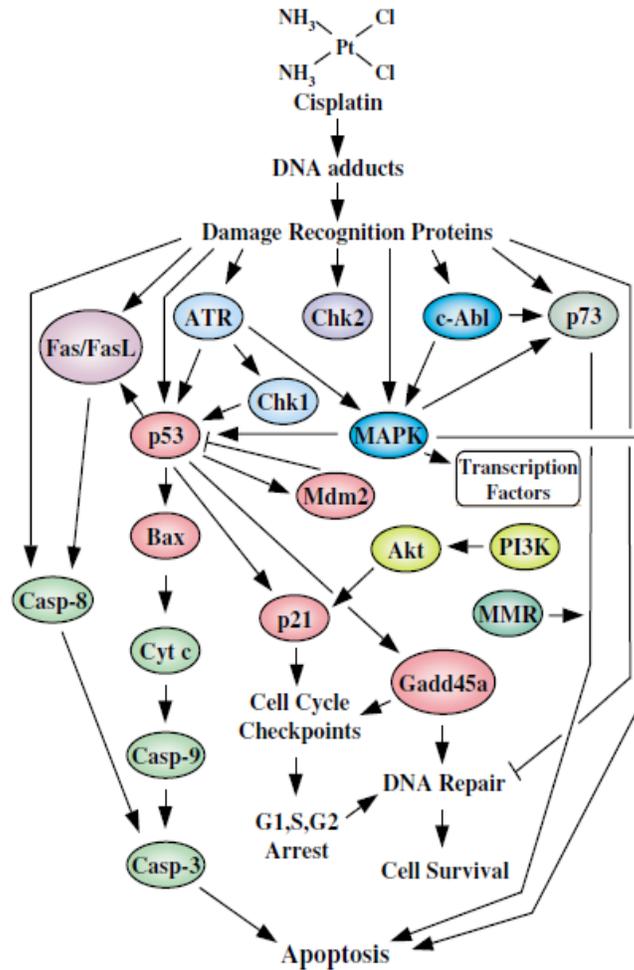
El diagnóstico del cáncer de ovario es complicado debido a que en las etapas tempranas suele ser asintomático; sin embargo, en las etapas más tardías (III y IV) el diagnóstico es más eficiente (Gloss & Samimi, 2015; Gallardo-Rincón et al., 2016). Actualmente el diagnóstico del cáncer de ovario epitelial se puede determinar con biomarcadores séricos como CA-125, CA-19-9, TAG-72, entre otros (Gupta y Lis, 2009; Dede et al., 2006; Ponnusamy et al., 2007).

<b>Etapas clínicas del cáncer de ovario proporcionado por la FIGO</b>	
<b>Estadio I. Enfermedad limitada a los ovarios solamente</b>	
Ia	Se limita solamente a un ovario afectado
Ib	Ambos ovarios están afectados
Ic	Ia o Ib con tumor en la superficie de uno o ambos ovarios, positivo a ascitis, positivo a lavados peritoneales
<b>Estadio II. Enfermedad que se extiende hasta la pelvis</b>	
IIa	El cáncer se ha diseminado a las trompas de Falopio o el útero o ambas
IIb	El cáncer se disemina hacia otros tejidos pelvicos
IIc	IIa y IIb con tumor en la superficie de uno o ambos ovarios, positivos a ascitis, positivo a lavados peritoneales
<b>Estadio III. Enfermedad abdominal o que afecta los nódulos linfáticos o ambos</b>	
IIIa	El cáncer se ha diseminado microscópicamente de la pelvis hasta el abdomen
IIIb	El cáncer se ha diseminado de la pelvis hasta el abdomen y mide 2 cm
IIIc	El cáncer se ha diseminado de la pelvis hasta el abdomen y mide más de 2 cm con diseminación a los ganglios linfáticos
<b>Estadio IV. Metástasis en el hígado deben ser parenquimatosas</b>	
IVa	El tumor progresa hasta el líquido que rodea los pulmones y el hígado

**Tabla 1. Etapas clínicas del cáncer de ovario y sus características de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en 2017.** Características patológicas de los estadios I, II, III y IV del cáncer de ovario.

## **2.0 Tratamiento del cáncer de ovario**

El tratamiento para el cáncer de ovario epitelial es muy variable y es dependiente de cada estadio que presente la paciente. Es posible tratar el cáncer de ovario con cirugía y quimioterapia, utilizando fármacos antineoplásicos a base de platino como cisplatino o carboplatino que son fármacos de primera elección, que inducen la formación de aductos en el DNA conduciendo a la muerte celular (DiSilvestro y Alvarez-Sercord, 2018) (Figura 1).



**Figura 1. Mecanismo de acción y vías de señalización desencadenadas por el cisplatino.** Vías de señalización implicadas en la respuesta celular ante el cisplatino, dando como resultado la muerte celular (Siddik, 2003).

En etapas tempranas de la enfermedad (como la etapa I) se requiere la cirugía con el objetivo de clasificar la etapa y la citoreducción óptima, que consiste en extirpar tumores en el ovario de una manera óptima dejando remanentes de menos de 1 mm. Posteriormente al procedimiento quirúrgico es necesario utilizar quimioterapia para una erradicación total de los tumores (Kajiyama et al. 2019).

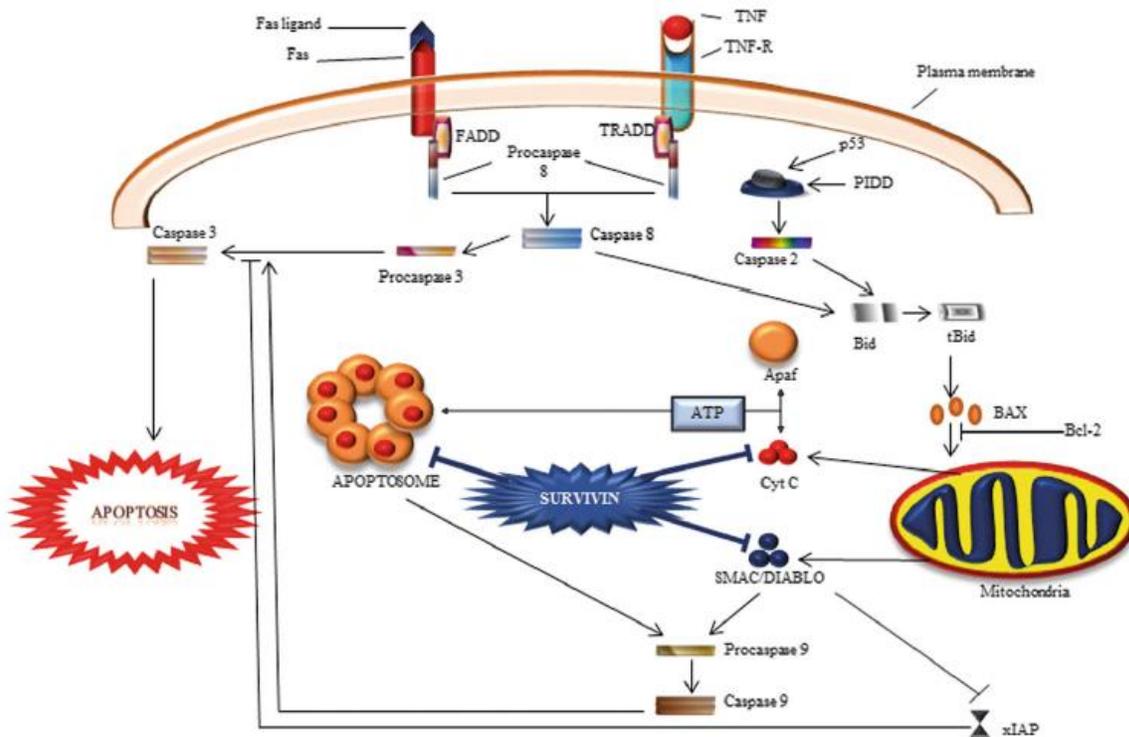
Las etapas tardías de la enfermedad (como III y IV) comprometen aún más la salud de la paciente debido a que los tumores tienden a invadir otros órganos. Para estas etapas se utilizan los fármacos antineoplásicos entre los que se encuentran los de base de platino como el cisplatino o carboplatino, ya sea en combinación con

paclitaxel o docetaxel, siendo administrados por vía intravenosa o intraperitoneal. Todo esto en su conjunto, ocasiona la muerte celular por apoptosis por la vías intrínseca y extrínseca (Siddik, 2003). Otra estrategia utilizada en estas etapas, es la administración de fármacos antiangiogénicos que inhiben la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como Bevacizumab (Jayson et al., 2014). Algunas nuevas estrategias para pacientes sensibles a los fármacos a base de platino es el uso de inhibidores de la poli ADP-ribosa (PARP) como el olaparib, al inhibir PARP (1, 2 y 3) y su mecanismo principal es que la célula no puede reparar las roturas de cadena sencilla del DNA, ya que el olaparib se une al sitio activo del PARP asociado al ADN, lo que evita su disociación bloqueando la reparación. Por lo tanto, se induce la muerte celular, siendo recomendado en etapas tardías del cáncer seroso y germinales de ovario (Ledermann & Pujade-Lauraine, 2019). Una alternativa adicional es el tratamiento endocrino debido a que las pacientes presentan el receptor de estrógeno, expresado en un 60% de los casos, por lo que, con frecuencia, en estadios tempranos se utilizan fármacos como el tamoxifeno (Jayson et al., 2014).

### **3.0 Proteína survivina como blanco terapéutico del cáncer**

La survivina es una proteína de 16.4 kDa aproximadamente, perteneciente a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis. Esta proteína se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a agentes quimioterapéuticos en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de ovario., una proteína con múltiples funciones celulares, y que particularmente es conocida por su efecto anti-apoptótico, teniendo como mecanismo principal inhibir algunas caspasas como la 3 e interfiriendo con la liberación de factores importantes de la mitocondria (Song et al.,2019). Esta proteína tiene diferentes funciones en la célula; para suprimir la muerte celular programada inhibe la liberación de APAF-1 de la mitocondria y además inhibe Smac/DIABLO, impidiendo la activación de la vía intrínseca (Khan et al., 2017) (Figura 2). Además, se ha reportado que survivina puede inhibir la caspasa 3, 7, algunas ciclinas dependientes de cinasas (CDKs) como la 4 y la 2 interactúan para

continuar con el proceso del ciclo celular, lo que promueve la división celular en la enfermedad maligna I (Jaiswal et al.,2015).



**Figura 2. Mecanismo de acción de survivina para inhibir la apoptosis.** Diagrama del mecanismo de acción de survivina sobre proteínas relacionadas a la apoptosis extrínseca como intrínseca (Khan et al., 2017).

Survivina participa en la mitosis por medio de la interacción con el complejo cromosomal CPC (siglas en inglés; Chromosomal Passenger Complex) y ayuda a linear eficientemente los cromosomas, este mecanismo es a través de la cinasa aurora-B asociándose con los centrómeros (Knauer et al., 2006). En células tumorales survivina participa en la migración por medio de la alteración de adhesiones focales que son reguladas por c-Src (Dunajová et al., 2016) además está involucrada con VEGF que le confiere un papel pro-angiogénico (Sanhuesa et al., 2015). Estos mecanismos en su conjunto, les confiere a las células una mayor viabilidad, debido a que es un mecanismo de resistencia a este tipo de la muerte celular (Braný et al., 2017).

Es por ello que ciertos tratamientos para tratar el cáncer han contemplado múltiples estrategias para inducir la degradación de survivina, tales como RNA de interferencia que participa en la inhibición de la traducción de survivina y que han sido importantes para coadyuvar a los fármacos antineoplásicos durante el tratamiento (Devi, 2006; Van den Brand et al., 2018). Se han propuesto otras estrategias para inhibir a survivina y algunas de éstas ya se encuentran en fase clínica, como el uso del inhibidor YM155, el cual participa en la inhibición del promotor Sp1 para la transcripción de survivina (Cheng et al. 2016), estudios más recientes en etapas clínicas fase II se mostró un buen pronóstico en combinación con taxanos, mostrando un régimen bien tolerado en los pacientes (Tolcher et al., 2012). Otro inhibidor es shepherdin que presenta un mecanismo antagonista del complejo survivina-HSP (“heat shock protein”) (Plescia et al. 2005). Con todo lo anterior, las proteínas de la familia IAPs como survivina son un blanco contra diferentes tipos de cáncer incluido el cáncer ovárico epitelial ya que su degradación permite la inducción de la muerte celular por apoptosis.

#### **4.0 Los calicivirus como agentes inductores de la degradación de survivina y del establecimiento de apoptosis celular.**

Los calicivirus son capaces de inducir apoptosis como un mecanismo de propagación en el huésped, dicho mecanismo lo llevan a cabo los diferentes virus de la familia como; *norovirus humano* (HuNoV) (Herod et al., 2014; Benjamin et al., 2016), *norovirus murino* (MNV) (Bok et al., 2009) y *calicivirus felino* (FCV) (Natoni et al., 2006).

#### **4.1 Biología de *Calicivirus felino***

El FCV es un virus esférico no envuelto, de 27 a 40 nm de diámetro (Belliot et al. 2005), con un genoma de RNA de polaridad positiva de 7.5 kb aproximadamente conteniendo 3 marcos de lectura abiertos u ORFs (del inglés Open Reading Frames). El ORF1 codifica para las proteínas no estructurales cuya función es la de establecer las condiciones de la infección y de producción de los genomas de la progenie viral, mientras que los ORF 2 y 3 codifican para las proteínas estructurales

VP1 y VP2, que junto con el RNA genómico forman a las partículas virales. Particularmente la proteína VP1 se codifica como un precursor que posteriormente es procesado para dar origen a la VP1 madura y a una proteína conocida como líder de la cápside o LC, compuesto por 124 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 14 kDa (Sosnovtsev et al., 1998), la cual se ha asociado con el efecto citopático (Abente et al., 2019). Una vez formadas las partículas virales maduras, éstas se liberan de las células infectadas mediante el mecanismo de apoptosis intrínseca.

#### **4.2 Apoptosis intrínseca.**

La apoptosis es un conjunto de mecanismos altamente regulados, evolutivamente conservados que inducen a la muerte de la célula y que juegan un papel esencial en el desarrollo, homeostasis e inmunidad. Los factores que pueden desencadenar este mecanismo son la radiación, el estrés celular, la privación de nutrientes e infecciones virales (Thomson, 2001). La vía intrínseca es independiente de receptores que inician el estímulo en la membrana plasmática de la célula y principalmente se lleva a cabo por la liberación de proteínas de la mitocondria al citosol como Apaf-1 y citocromo c que junto con caspasa-9 forman el apoptosoma y conducen a la activación de la caspasa-3 y finalmente a la muerte celular. Esta vía es regulada principalmente por proteínas de la familia Bcl-2, como Bax y Bad (Green y Llambi, 2015). Asimismo, Smac/DIABLO, otra proteína que se localiza en la mitocondria tiene dos funciones pro-apoptóticas principales: 1) la liberación del citocromo c para formar el apoptosoma y 2) la inhibición de las IAPs como survivina y X-IAP (Arnt y Kaufmann, 2003). Sin embargo, survivina también tiene una participación en la inhibición directa de Smac/DAIBLO, permitiendo la inhibición de factores involucrados en la vía intrínseca de la apoptosis (Song et al., 2004).

### **4.3. Proteína LC, efecto citopático y apoptosis**

El efecto citopático que provocan el FCV en células CrFK ha sido reportado en la literatura y es llamado redondeamiento celular, del inglés “round-shaped” o “cell rounding” donde las células al presentar la infección, cambian su morfología clásica con proyecciones citoplásmicas a un fenotipo redondo. Sosnovtsev y colaboradores en 2003 muestran que en cultivos de células CrFK (epiteliales de riñón de gato) este cambio de fenotipo se observa a las 4 horas postinfección a una MOI de 1, que ocasiona una separación en la distribución celular por todo el campo observada como disrupción de la monocapa celular. Concomitantemente, ocurre a nivel molecular un daño en la membrana celular, fragmentación de DNA y el incremento de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9, las cuales son indicativas de la activación de la apoptosis (Chang et al., 2008; Sosnovtsev et al., 2003). En nuestro grupo de trabajo se ha reportado recientemente que la inducción de la apoptosis por FCV es debido a la proteína líder de la cápside o LC. Cuando se expresa la proteína LC en células CrFK se induce este efecto citopático de manera similar que en las células infectadas por FCV (Abente et al., 2013; Barrera-Vázquez et al., 2019). Recientemente en nuestro laboratorio, Barrera Vázquez y colaboradores mediante ensayos de transfección de la proteína viral LC determinaron que esta proteína es la responsable de la degradación de las proteínas survivina y X-IAP vía proteosomal, del procesamiento de la ADP ribosa polimerasa (PARP), uno de los blancos celulares de la caspasa-3, y del establecimiento de la apoptosis (Barrera-Vázquez et al. 2019).

## Justificación

El cáncer de ovario epitelial es un problema de salud pública en México debido a que ocupa el segundo lugar en incidencia de los tumores ginecológicos. Su incidencia es de 4,759 casos al año y produce 2,765 defunciones, por lo que se considera un tipo de cáncer letal. Además, el costo del tratamiento es elevado y la tasa de éxito es muy variable debido a que depende de la etapa y el subtipo histológico de las pacientes, además, pueden presentar resistencia lo que se asocia con la alta expresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) como survivina y X-IAP que favorecen la permanencia y proliferación de estas células dañadas. Por lo anterior, es necesario continuar con la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para combatir el cáncer de ovario epitelial. El campo de la virología ha impulsado el entendimiento de los mecanismos moleculares de las células y de los propios virus, estudios previos y de nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la proteína LC de *calicivirus felino* tiene un efecto citotóxico en células CrFK y es capaz de regular negativamente a la proteínas inhibidora de la apoptosis survivina e inducir apoptosis, por lo que se propone que esta proteína viral podría inducir la apoptosis de células tumorales que sobre expresan a survivina

## **Hipótesis**

La proteína LC de FCV causa la degradación de la proteína survivina, por lo tanto, induce apoptosis en las células tumorales SKOV3.

### **Objetivo general**

Determinar el efecto pro-apoptótico de la proteína LC de FCV sobre las células tumorales SKOV3.

### **Objetivos particulares**

Comparar los niveles de expresión de survivina en células tumorales (SKOV3 y Huh-7) y no tumorales (BEAS-2B y CrFK).

Determinar el efecto citopático y la viabilidad celular de células SKOV3 transfectadas con la proteína LC.

Determinar la integridad de survivina y la inducción de la apoptosis en células SKOV3 transfectadas con la proteína LC.

## **Materiales y métodos**

### **Líneas celulares**

Las células SKOV3, derivadas de líquido de ascitis de un cáncer de ovario epitelial (ATCC®, HTB-77™) se mantuvieron en medio RPMI Advance 1640 suplementado con SFB (suero fetal bovino) al 1% a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Por su parte, las células de riñón de gato Crandell Reese (CrFK) y las células epiteliales de pulmón (BEAS-2B, ATCC®, CRL-9609™) se mantuvieron en medio DMEM (medio mínimo esencial Dubecco) suplementado con SFB al 5% a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células de hepatocarcinoma Huh-7 se mantuvieron en medio DMEM Advance suplementado con SFB al 7% a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células no tumorales de pulmón BEAS-2B (ATCC®, CRL-9609™) se mantuvieron en DMEM suplementado con SFB al 5% a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Ensayo de infección**

Las células CrFK se infectaron o no con el FCV a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 en MEM libre de suero durante 1 h a 37 °C, posteriormente se removió el medio y las células se lavaron dos veces con PBS 1X. Finalmente se agregó medio de mantenimiento (MEM con suero al 2%) y los extractos proteicos totales se obtuvieron a las 0, 1, 3, 5, 7 y 9 hpi. El efecto citopático se documentó mediante el uso de un microscopio óptico en campo claro.

### **Propagación de los plásmidos**

Colonias de bacterias *E. coli* DH5- $\alpha$  transformadas por choque de calor con los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC se crecieron por 16 horas a 37°C en placas de LB+Agar. La presencia del inserto de LC en el plásmido pAmCyan, se corroboró mediante un ensayo de PCR colony utilizando los oligos (correspondientes a LC) FW5'-ACTGGCTCGAGATGTGCTCAACCTGCGC-3', y RV5'-GCACAAGCTTTTCCAATCTGAACAATGGC-3'. Brevemente, las colonias transformadas fueron picadas con un palillo estéril y resuspendidas en 10  $\mu$ L de agua bidestilada; un  $\mu$ L de medio se mezcló con los reactivos: H<sub>2</sub>O purificada, Buffer universal, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y Taq polimerasa. Se utilizó un termociclador donde se corrieron 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C, 30 segundos a

72 °C y su posterior detenimiento a 4 °C. Finalmente, se realizó un gel de agarosa al 2% y se colocó 1 µL de muestra obtenida de la PRC para observar los amplicones.

### **Anticuerpos**

Los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de Western blot se diluyeron en TBS-Tween 20 al 1% con 1% de leche de la siguiente manera: anti-RCFP (anti-Cyan, vector) (1:1000), anti-survivina (1:2000), anti-GAPDH (1:40000), anti-PARP1 (1:5000) y anti-Procaspasa3 (1:2000) y se incubaron a 4 °C toda la noche. Los anticuerpos secundarios anti-ratón para PARP (1:10000), y anti-conejo para RCFP (1:5000), survivina (1:5000), GAPDH (1:10000) y Procaspasa-3 (1:5000) (SantaCruz Biotechnology, SantaCruz, CA) se diluyeron en TBS-Tween 20 al 1% y leche al 1% y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h.

### **Transfección transitoria de LC en CrFK y SKOV3**

En una placa de 6 pozos (Corning®) se sembraron células CrFK y SKOV3 para tener a las 24 h una confluencia del 70 al 80%. Para la transfección de las células CrFK, se utilizaron 3.5 µg de plásmido pAmCyan-N1 (Clontech Laboratories, Inc.) y/o pAmCyan-LC y 5 µL de Lipofectamine® reagent 2000. Para la transfección de las células SKOV3 se utilizaron 5 µg de los plásmidos pAmCyan-N1 o pAmCyan-LC y 5 µL de Lipofectamine® reagent 2000. La transfección se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante por 48 h. La eficiencia de transfección se monitoreó cada 12 h en un microscopio de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE Ti) y se documentó a las 24 y 48 horas postransfección, mediante el uso del programa NIS-Element AR.

### **Extractos proteicos totales**

Las cuatro líneas celulares SKOV3, CrFK, Huh-7 y BEAS-2B se cultivaron en placas Petri de 100 mm hasta tener la confluencia del 80 al 90%. Se obtuvo el pellet celular mediante centrifugación a 13 000 rpm durante 10 min a 4 °C y se realizaron 3 lavados con PBS 1X (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, HPO<sub>4</sub> 1.44 g, NaCl 0.8 g y KCl 2 g). Posterior a los lavados, el pellet celular se resuspendió en buffer de lisis RIPA (Biorad™) (PBS 1X, Tritón x-100 1%, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM y Glicerol al 5%) a temperatura de 5 °C y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a

un tubo limpio en presencia de inhibidores de proteasas (20X Roche™). La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry con el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) y en un espectrofotómetro BioTek ELx808.

### **Western blot**

Extractos proteicos totales (30 µg) se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), y se transfirieron en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% durante 1 h, se incubaron a 4 °C toda la noche con los anticuerpos primarios, se lavaron con TBS-Tween al 1%, se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos a temperatura ambiente durante 2 h, y se revelaron utilizando el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). La cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas de interés se realizó mediante el análisis de la intensidad de las bandas escaneadas utilizando el software ImageJ expresando los resultados en valores absolutos y normalizados con respecto al control de carga GAPDH. Los valores de la significancia estadística (Análisis de varianza de 1 vía) de tres ensayos independientes se calcularon usando el software GraphPad Prism 6.0.

### **Viabilidad celular**

Las células transfectadas con los distintos plásmidos se resuspendieron en 500 µL de medio DMEM y se añadió un volumen igual de una solución de azul tripano. Finalmente, por medio de un hematocitómetro (o cámara de Neubauer) se realizó el conteo de células viables y muertas por muestra y el análisis estadístico (Análisis de varianza de 1 vía) se realizó mediante el uso del programa GraphPad Prism 6.0.

### **Análisis morfológico y cuantificación celular**

Las células CrFK como SKOV3 no transfectadas o transfectadas con pAmCyan y pAmCyan-LC o por 48 h se analizaron con un microscopio óptico (20x) y con ayuda del programa NIS-Element AR se cuantificaron las células que presentaban morfología poligonal (o típica) mediante el análisis de 4 campos por cada línea celular y en las condiciones; células no transfectadas, transfectadas con pAmCyan

y pAmCyan-LC. Posteriormente se llevó a cabo el análisis estadístico (Análisis de varianza de 1 vía) de los datos con el programa GraphPad Prism 6.0.

## Resultados

### Inducción del efecto citopático y degradación de survivina en células CrFK infectadas con el FCV.

Para corroborar el efecto citopático que induce el FCV en las células CrFK y la degradación de la proteína survivina, células CrFK se infectaron con el FCV a una MOI de 5 y se realizó una cinética de infección de 9 h y las células se analizaron por microscopía óptica. En la figura 3, las células CrFK control o no infectadas se observan alargadas y la monocapa se mantiene confluyente e íntegra. Esta morfología se observa de manera similar en las células infectadas hasta las 3 h postinfección (hpi) (Figura 3). A la cuarta hora posterior a la infección se comienza a observar una reducción de la integridad de la monocapa y un redondeamiento celular que se observa como el típico efecto citopático o daño celular característico de las células infectadas, que aumenta a las 5, 7 y 9 hpi (Figura 3), corroborando que durante el transcurso de la infección por FCV se induce un cambio de fenotipo celular.

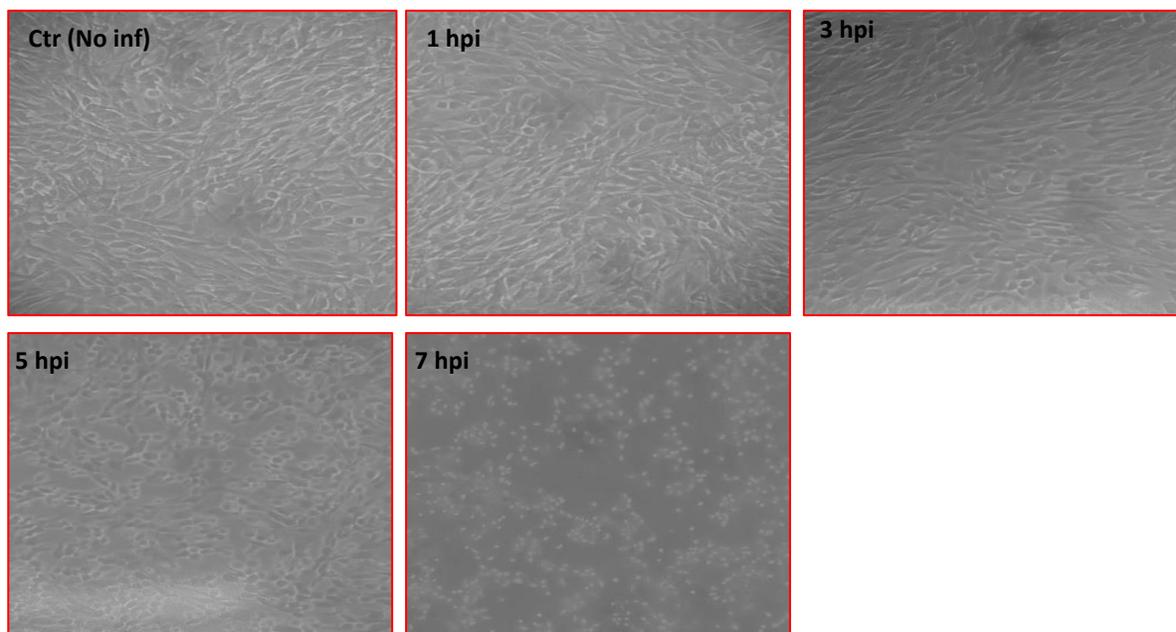
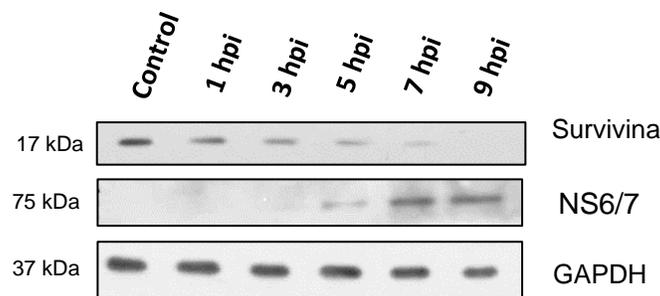


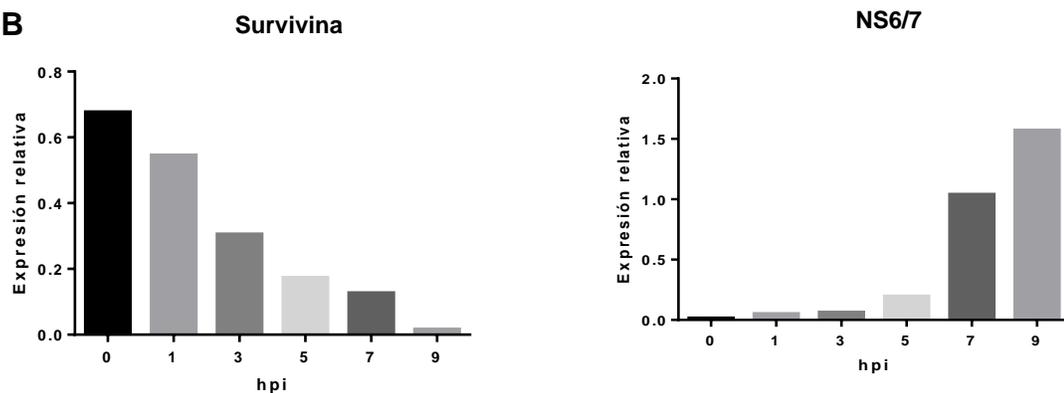
Figura 3. Efecto citopático en células CrFK infectadas con FCV. Células CrFK se infectaron o no con una MOI de 5 y el efecto citopático se evaluó cada hora durante 7 h mediante un microscopio óptico.

Una vez corroborado el efecto citopático en las células infectadas con FCV, se obtuvieron extractos proteicos totales. Los niveles de expresión de survivina y de proteína viral (LC) se determinaron mediante ensayos de western blot (Figura 4). Los niveles de survivina se observan semejantes en las células no infectadas e infectadas hasta las 3 h; a partir de las 5 hpi se observa una reducción de los niveles de survivina de aproximadamente del 50% a las 5 h que aumenta hasta las 7 y 9 hpi tiempo en el cual ya no se detectó de la proteína (Figura 4B). La degradación de survivina a partir de las 5 hpi coincide con la detección del efecto citopático (Figura 3). La expresión de NS6/7 de FCV se utilizó como control de infección (Figura 4B).

**A**



**B**



**Figura 4. Degradación de survivina durante la infección con FCV.** A) Extractos proteicos totales de células CRFK no infectadas e infectadas a 1, 3, 5, 7 y 9 hpi con el FCV a una MOI de 5, se analizaron mediante SDS-PAGE. La expresión de proteínas fue analizada por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra

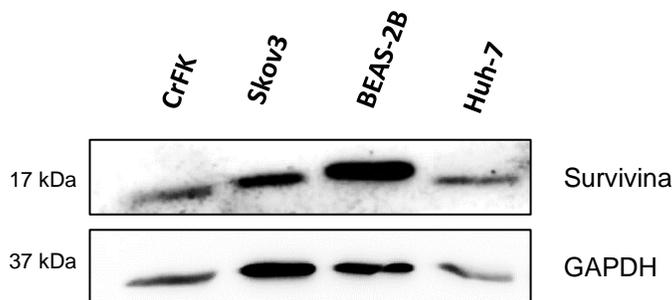
survivina. NS6/7 indica la infección. GAPDH se utilizó como control de carga. B) Intensidades de las bandas de survivina y C) de NS6/7 en los diferentes tiempos de la cinética.

Estos ensayos permitieron corroborar la degradación de survivina como consecuencia de la infección y contar con extractos para ser utilizados como controles en los ensayos de detección de survivina en las distintas líneas celulares.

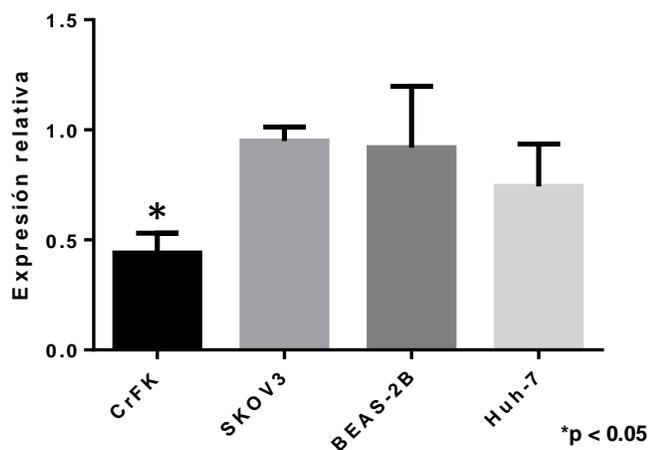
### **Niveles de survivina en líneas celulares tumorales y no tumorales**

Las líneas celulares tumorales sobreexpresan a la proteína survivina (Xu et al., 2004), por lo que se buscó determinar el efecto de la expresión de LC en estas líneas celulares y analizar si también inducía su degradación y el establecimiento de la apoptosis. Inicialmente quisimos determinar los niveles de survivina en dos líneas celulares tumorales SKOV3 (cáncer de ovario epitelial) y Huh-7 (hepatocarcinoma), y en la línea celular no tumoral BEAS-2B (células bronquiales de humano) en comparación con los niveles observados en la línea CrFK. Para ello, realizamos extractos proteicos totales de cada una de las líneas celulares y los niveles de survivina los analizamos mediante ensayos tipo western blot. En la Figura 5B observamos que las líneas tumorales tienen aproximadamente el doble de la cantidad de survivina detectada en la línea celular CrFK, La línea celular no tumoral BEAS-2B, también presentó una mayor cantidad de survivina, semejante a los observada en las líneas tumorales.

**A**



**B**

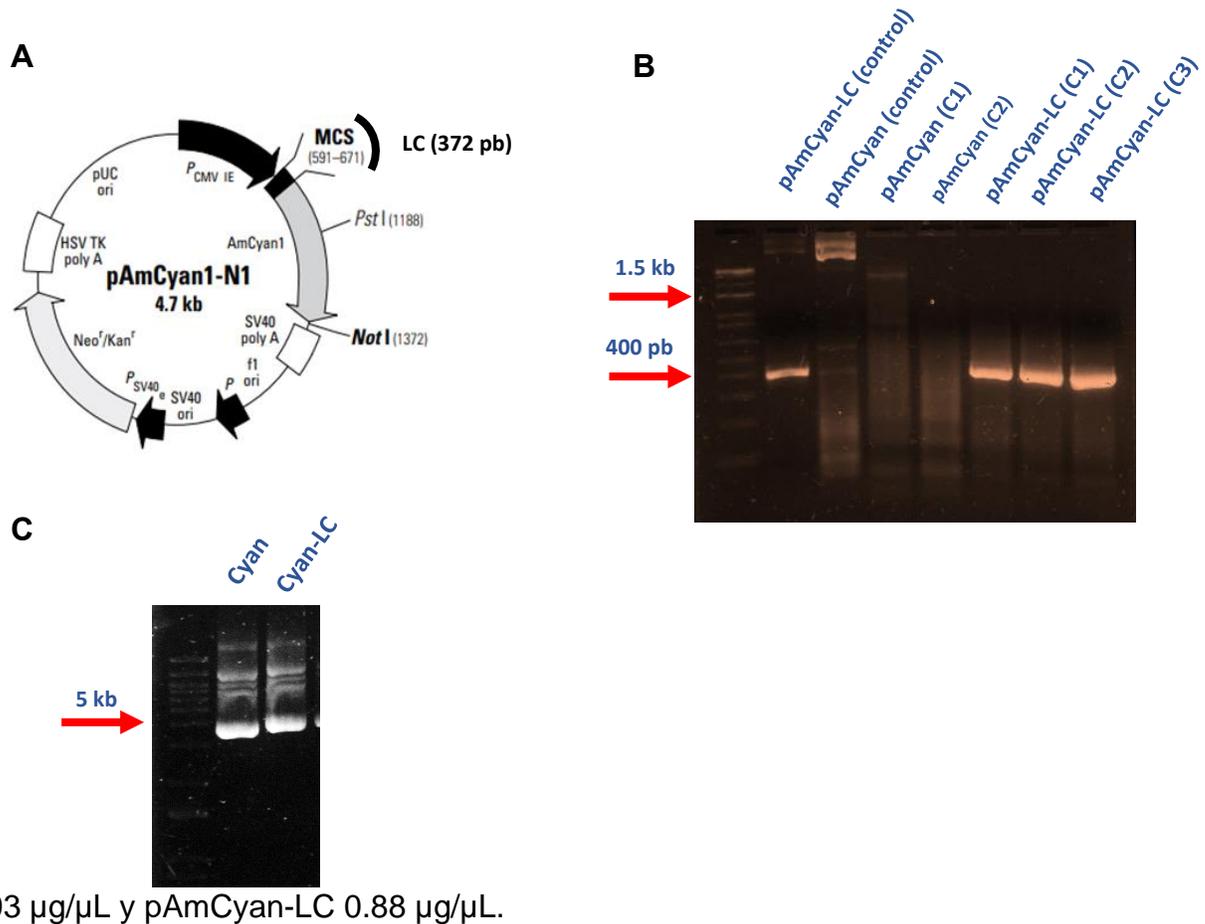


**Figura 5. Expresión de survivina de líneas celulares tumorales y no tumorales.** Extractos proteicos totales de células CrFK, SKOV-3, BEAS-2B y HUH-7 se analizaron mediante SDS-PAGE. A) La expresión de proteínas fue analizada mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos contra Survivina y GAPDH. B) Análisis estadístico de las intensidades de las bandas obtenidas del western blot, las bandas se analizaron con el programa Image J y la estadística (ANOVA 1 vía) con el programa GraphPad 6 (\* $p < 0.05$ ) de 3 ensayos independientes.

### **Propagación de los plásmidos pAmCyan y pAmCyan-LC en bacterias DH5 $\alpha$**

Una vez determinado que las líneas celulares tumorales efectivamente expresan una mayor cantidad de survivina que las células CrFK, se decidió hacer los ensayos de expresión de la proteína LC y determinar su efecto en la reducción de survivina e inducción de apoptosis. Para ello, inicialmente propagamos los vectores de expresión pAmCyan y pAmCyan-LC (Figura 6A) en bacterias DH5 $\alpha$  y determinamos la presencia de la secuencia de LC mediante una PCR colony. En la figura 5B observamos la presencia de un amplicón de 400 pb aproximadamente, en las tres colonias transformadas con pAm-Cyan-LC. La migración de los amplicones coincide con el amplicón de pAmCyan-LC purificado previamente con la técnica de columna de resina de intercambio iónico con el KIT “midi fast ion plasmid” y lo utilizamos como control. Asimismo, no obtuvimos amplificación cuando se ensayaron las bacterias transfectadas con el plásmido pAmCyan. Ambos plásmidos se purificaron de los cultivos de bacterias mediante el KIT “midi fast ion plasmid” que ya se

mencionó previamente. La integridad de los plásmidos se corroboró en un gel de agarosa al 0.7% (Figura 6C) y la cuantificación se realizó mediante el uso de un NanoDrop que nos permitió determinar que la concentración de pAmCyan fue de

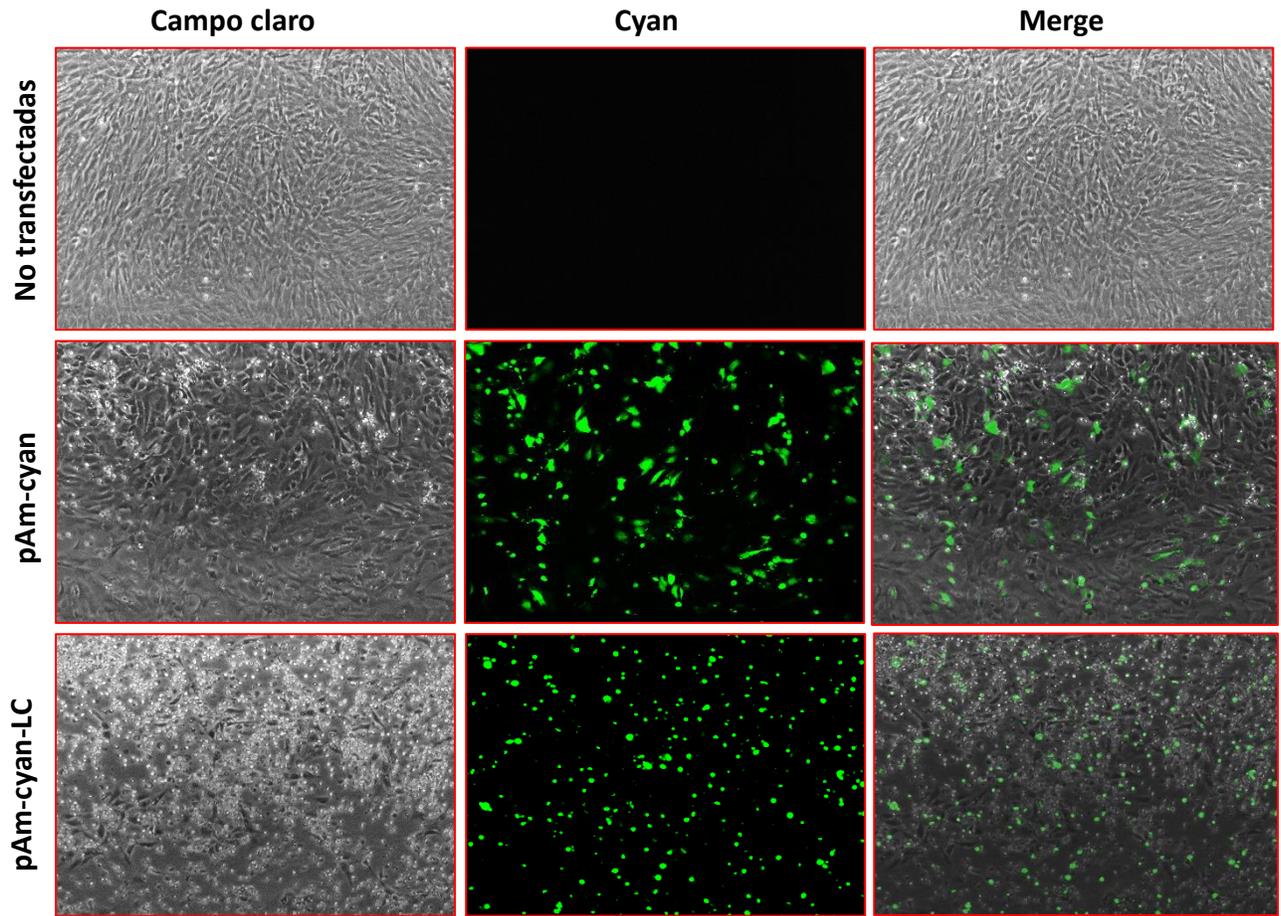


**Figura 6. Identificación y purificación de los plásmidos pAmCyan y pAmCyan-LC.** A) Esquema del plásmido pAmCyan1-N1 y la secuencia de LC de aproximadamente 372 pb insertados en el vector de expresión. B) Gel de agarosa al 0.7% representado los resultados de las amplificaciones obtenidas mediante PCR colony, de diferentes colonias DH5 $\alpha$  utilizadas para propagar los plásmidos (pAmCyan y pAmCyan-LC). Se utilizaron “primers” específicos para la secuencia de LC y se cargó 1  $\mu\text{L}$  por muestra obtenida de la reacción. C) Gel de agarosa 0.8% representando muestras de los plásmidos pAmCyan y pAmCyan-LC previamente purificadas mediante el KIT “midi fast ion plasmid”.

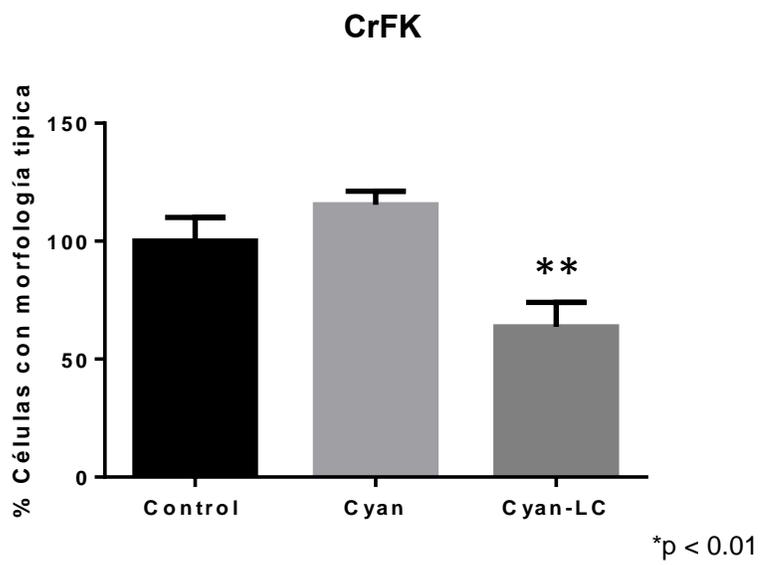
## **La expresión de LC en células SKOV3 induce cambios en la morfología celular**

Una vez que los plásmidos pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC se purificaron, se realizaron los ensayos de transfección de las células CrFK y se evaluó el efecto citopático mediante microscopía de luz. Como podemos observar en la Figura 7A, las monocapas de las células sin transfectar (control) y transfectadas con el plásmido pAm-Cyan se observan homogéneas y la morfología celular típica de formas poligonales con citoplasma alargado, como se ha reportado anteriormente (Barrera-Vázquez et al., 2019). Sin embargo, cuando se expresa la proteína LC se observa una disrupción de la integridad de la monocapa y un cambio en la morfología de las células, que se aprecia como un redondeamiento muy semejante al efecto citopático observado durante la infección (Figura 3). Además, con ayuda del programa NIS-Element AR se cuantificó las células que presentan una morfología alargada (células sanas o sin efecto citopático) en las tres condiciones, observamos que cuando se expresa la proteína LC hay una reducción estadísticamente significativa de esta población de aproximadamente el 40% en comparación con el grupo control y el vector vacío (Figura 7B).

**A**



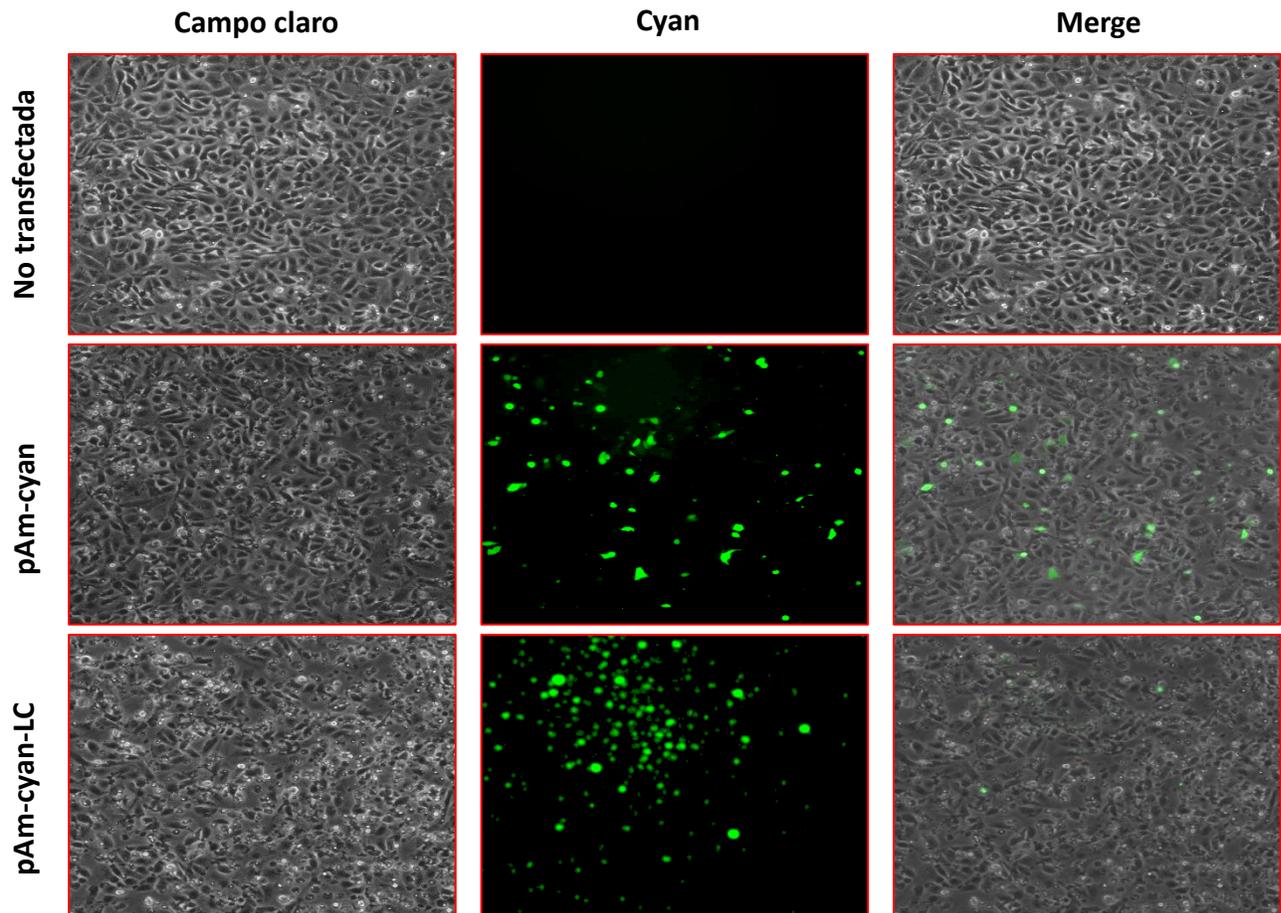
**B**



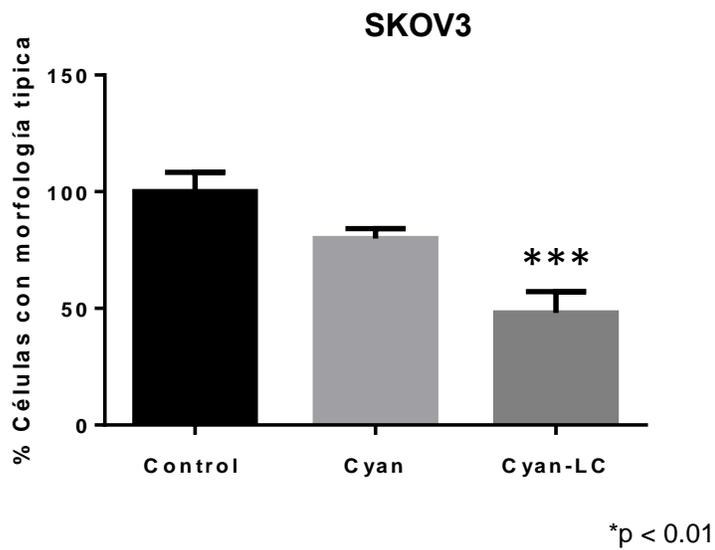
**Figura 7. La expresión de la proteína LC en células CrFK induce efecto citopático y reduce la morfología típica de las células.** A) Células CrFK se transfectaron o no con los vectores pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC por 48 h y el efecto citopático fue evaluado por microscopía óptica y epifluorescencia. B) El porcentaje de las células CrFK con morfología típica, no transfectadas y transfectadas con pAmCyan y pAmCyan-LC a las 48 hpt, se evaluó con el programa NIS-Elements AR mediante la cuantificación de 4 campos por condición. La estadística se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (\*p < 0.01).

Una vez corroborado que la expresión de la proteína LC produce el efecto citopático en las células transfectadas, como había sido reportado (Barrera Vázquez et al; 2019), realizamos los ensayos de expresión de LC en las células tumorales SKOV3. Al transfectar a la proteína LC en células SKOV3, observamos que tanto las células no transfectadas (control) y el vector vacío (pAmCyan) las monocapas celulares se mantienen íntegras y homogéneas (Figura 8A). La morfología se mantiene poligonal y el citoplasma alargado, que es típico de líneas celulares epiteliales. Sin embargo, cuando se expresa la proteína LC (pAmCyan-LC) en las células se observa una disrupción de la integridad de la monocapa y un cambio en la morfología de las células, que se aprecia con un redondeamiento muy semejante al efecto citopático producido por la infección por FCV (Figura 3) y en las células CrFK transfectadas con la proteína LC. Además, al cuantificar las células que tienen una morfología alargada en las tres condiciones, observamos que cuando se expresa la proteína LC hay una reducción estadísticamente significativa de esta población de aproximadamente el 50% en comparación con el grupo control y el vector vacío (pAm-Cyan) (Figura 8B). La disrupción de la integridad de la monocapa y el cambio en la morfología de las células SKOV-3 que expresaron a la proteína LC, es semejante al observado en las células CrFK a pesar de que estas poseen el doble de la cantidad de survivina que las células CrFK.

**A**



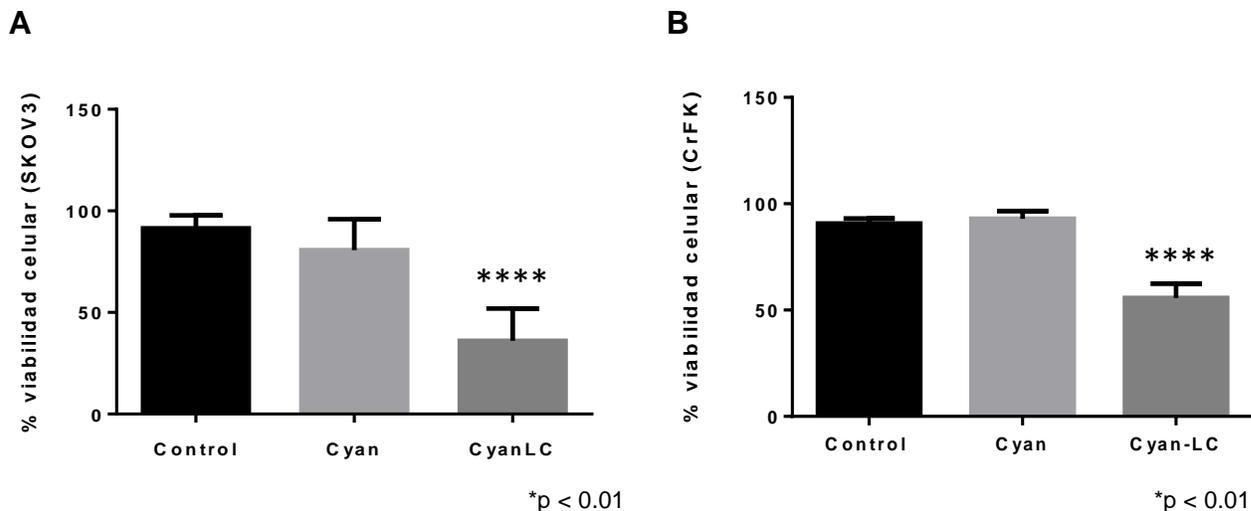
**B**



**Figura 8. La expresión de la proteína LC en células SKOV3 induce efecto citopático y altera la morfología típica de las células.** A) Células SKOV3 se transfectaron o no con los vectores pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC por 48 h y el efecto citopático fue evaluado por microscopía óptica y epifluorescencia. B) El porcentaje de células SKOV3 con la morfología típica, no transfectadas y transfectadas con pAmCyan y pAmCyan-LC a las 48 hpt, se evaluó utilizando el programa NIS-Elements AR mediante la cuantificación de 4 campos por condición. La estadística se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (\*p < 0.01).

### **La expresión de LC en células SKOV3 disminuye la viabilidad celular**

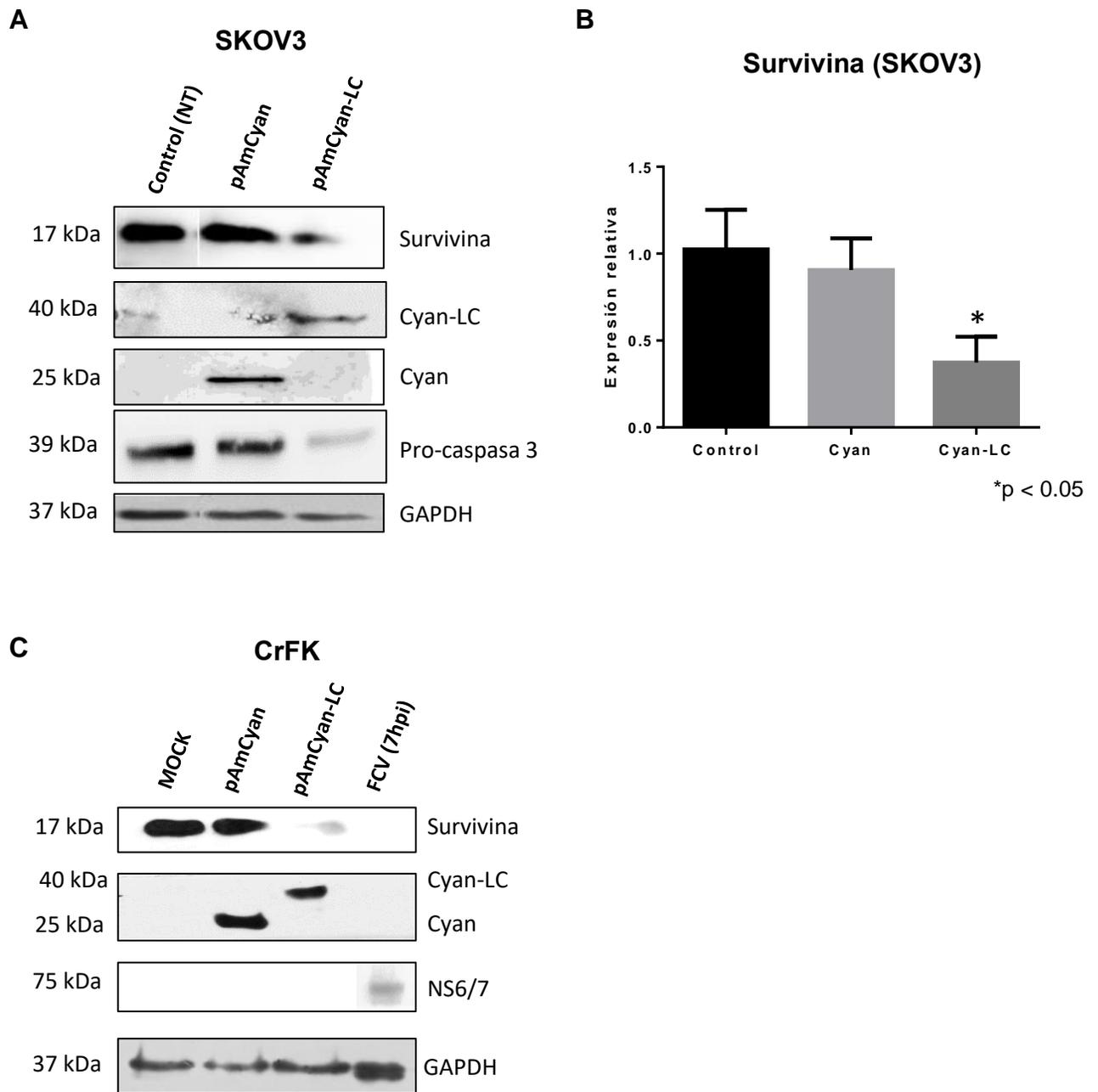
Una vez demostrado que la expresión de la proteína LC induce cambios en la morfología de al menos el 50% de las células SKOV3, decidimos cuantificar las células viables en cada condición ensayada. De acuerdo al ensayo de viabilidad por azul tripano, cuando se expresa la proteína LC (pAmCyan-LC) en SKOV3 la viabilidad celular presenta una disminución estadísticamente significativa del 60%, lo que coincide con el porcentaje del efecto citopático en estas mismas células (Figura 8) y en comparación con el grupo control y el vector vacío, que presentaron el 100% de viabilidad como se esperaba (Figura 9A). Asimismo, cuando la proteína LC (pAmCyan-LC) se expresa en las células CrFK hay una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular del 50% en comparación con el grupo control y pAmCyan. En la gráfica se puede observar que la disminución es de aproximadamente del 50% (figura 9B). Estos datos indican que tanto en células SKOV3 como en células CrFK ocurre una reducción importante en la viabilidad de las mismas cuando expresan a la proteína LC, que coincide con el porcentaje de efecto citopático en estas mismas células.



**Figura 9. La expresión de la proteína LC en células CrFK y SKOV3 reduce la viabilidad celular.** A) Porcentaje de la viabilidad celular en SKOV3 sin transfectar (control) o transfectadas con el plásmido pAm-Cyan y pAm-Cyan-LC a 48 hpt. B) Porcentaje de la viabilidad celular en CrFK 48 hpt. La viabilidad se determinó por medio de azul tripano y se cuantificó por medio de un hematocitómetro, realizando la estadística de los datos obtenidos con el programa GraphPad 6 (\*p < 0.01).

### La expresión de LC en células SKOV3 induce la degradación de survivina y la activación de caspasa 3

Debido a que observamos que al igual que en las células CrFK, la expresión de LC en las células SKOV3 causó un efecto citopático marcado y reducción de la viabilidad celular, era posible que esto fuera el resultado de la inducción de apoptosis. Es por ello que decidimos determinar los niveles de survivina en las células SKOV3 que expresan a la proteína LC por ensayos tipo western blot. Los niveles de survivina fueron semejantes tanto en el grupo de células no transfectadas como en el de células transfectadas con el plásmido pAmCyan, y no se detectó activación de la caspasa 3. En cambio, en células transfectadas con pAmCyan-LC se observó una reducción estadísticamente significativa del 60% en los niveles de survivina que correlaciona con la activación de caspasa 3 (Figura 10B). Todos los resultados en conjunto indican que la expresión de la proteína LC tanto en las células no tumorales CrFK como en las células tumorales SKOV3 induce la degradación de survivina y el establecimiento de la apoptosis.



**Figura 10. Regulación negativa de survivina y activación de caspasa 3 por medio de la expresión de la proteína LC de FCV en células SKOV3.** A) Se realizaron extractos totales de células SKOV3 sin transfectar y transfectadas con los plásmidos pAmCyan y pAmCyan-LC por 48 h. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE. La expresión de las proteínas fue analizada por western blot utilizando anticuerpos específicos para las proteínas de interés. La reducción de pro-caspasa 3 indica la presencia de la caspasa activa 3 que induce apoptosis, GAPDH es utilizado como control de carga y Cyan como vector vacío y vector más inserto LC. B) La intensidad de las bandas como survivina y GAPDH se utilizaron para realizar la expresión relativa de survivina, las imágenes de las bandas fueron escaneadas y cuantificadas con el programa Image J y finalmente se realizó la estadística de las bandas con el programa GraphPad Prism 6.0 (\*p < 0.05) de al menos 3 ensayos independientes. C) Extractos totales de células CrFK sin transfectar y transfectadas con el plásmido pAmCyan y pAmCyan-LC por 48 h. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE. La expresión de las proteínas fue

analizada por western blot utilizando anticuerpos específicos para las proteínas de interés. Se analizó la expresión de survivina y GAPDH como control de carga.

## Discusión

El cáncer de ovario es un problema importante de salud a nivel mundial. Particularmente el cáncer de ovario epitelial es de gran importancia en la salud pública en México debido a que ocupa el segundo lugar de los tumores ginecológicos con una alta incidencia, morbilidad y mortalidad. Uno de los problemas más importantes que presenta este padecimiento es la falta de estrategias para una detección oportuna. Aunado a ello, los tratamientos antineoplásicos tienen una tasa de éxito baja debido a que las pacientes presentan resistencia a la quimioterapia. Se ha reportado en la literatura, que dicha quimioresistencia se asocia con la alta expresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) como survivina y X-IAP que favorecen la permanencia y proliferación de estas células dañadas (Ausserlechner MJ, Hagenbuchner, 2016; Rathore et al., 2017).

La proteína survivina, un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) que se expresa fuertemente en órganos embrionarios y fetales pero que no ha sido reportada en la mayoría de los tejidos normales (Altieri, 2003a), se expresa en la mayoría de los tumores de humano, incluyendo al cáncer de ovario (Zaffaroni et al., 2005). Debido a que survivina inhibe la actividad de caspasas, los tumores que la expresan se vuelven altamente resistentes a la muerte celular por apoptosis. Resultados obtenidos en una gran variedad de estudios, indican que survivina es un factor potencial en la quimio-resistencia y radio-resistencia en tumores de células de humano, sugiriendo que las distintas estrategias para inhibir a la expresión de survivina, podrían contribuir a la sensibilización de los tumores a los agentes químicos y físicos (Zaffaroni et al., 2005). Una de las estrategias que ha sido ampliamente utilizada para inhibir la expresión de survivina, ha sido el uso de antagonistas que afectan directamente su expresión génica, como el uso de oligonucleótidos antisentido, ribozimas, pequeños RNAs de interferencia y mutantes dominantes negativos. En general, los resultados obtenidos mediante estas estrategias han demostrado la inducción de apoptosis espontánea en células tumorales (Zaffaroni et al., 2005) y el incremento en la eficiencia de algunos tipos de tratamientos convencionales como quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

Asimismo, el hecho de que survivina está involucrada en angiogénesis, favorece también la involución de la nueva vasculatura en el tumor (Nicholson, 2000). En resumen, estos estudios demuestran que utilizando como blanco la expresión del gen de survivina, se incrementa la sensibilidad de varios cánceres a la apoptosis.

El campo de la virología ha impulsado el entendimiento no solo de los virus sino de los mecanismos moleculares de las células. A este respecto, estudios previos y de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la proteína LC de FCV tiene un efecto citotóxico en células CrFK y es capaz de regular negativamente a la proteína inhibidora de la apoptosis survivina e inducir apoptosis (Barrera-Vázquez et al., 2019), por lo que se propone que esta proteína viral podría inducir la apoptosis de células tumorales que sobre expresan a survivina.

En este proyecto, evaluamos el efecto de la expresión de la proteína LC en las líneas tumorales SKOV3 de cáncer epitelial ovárico que corresponde al estadio IIIC de la enfermedad y Huh-7 de hepatocarcinoma, ya que se ha reportado que sobreexpresan survivina (Xu et al., 2004; Jaiswal et al., 2015; Cohen et al., 2003) en comparación con líneas celulares no tumorales, como la línea celular epitelial de riñón de gato CrFK utilizada como control en este trabajo y la línea celular bronquial BEAS-2B. Las líneas tumorales (SKOV3 y Huh-7) presentan una mayor cantidad de survivina (el doble aproximadamente) en comparación con la línea no tumoral CrFK; sin embargo, nosotros encontramos que la línea celular BEAS-2B, expresa a la proteína survivina en niveles similares a los que encontramos en las líneas tumorales SKOV3 y Huh-7. Una de las razones por la que las células BEAS-2B tiene una mayor expresión de survivina es que reportes indican que no cumple simplemente un papel en la inhibición de la apoptosis sino que es un mediador de citoprotección en células no cancerosas epiteliales (BEAS-2B) en el síndrome de dificultad respiratoria aguda, además participa en la respuesta al estrés celular tanto *in vivo* como *in vitro* (Terasaki et al., 2013). Con todo esto sugerimos que la línea BEAS-2B es propensa al estrés celular y survivina actúa en contra de estos estímulos que podrían inducir la apoptosis en dicha línea celular.

Una vez comprobado que las líneas tumorales expresan una gran cantidad de survivina, quisimos determinar el efecto de la expresión de la proteína LC de FCV en la línea tumoral SKOV3 y en las células CrFK. Para ello, propagamos, purificamos, y cuantificamos los plásmidos pAmCyan y pAmCyan-LC y los transfectamos inicialmente en las células CrFK y corroboramos los datos de Barrera-Vázquez (Barrera-Vázquez et al., 2019) que indican que la expresión de la proteína LC induce el efecto citopático semejante al observado durante la infección, en el 60% de las células transfectadas. Estos resultados correlacionan con la disminución de la viabilidad celular de aproximadamente del 50% que nosotros reportamos. Además, corroboramos que la expresión de LC correlaciona con la degradación de survivina y la inducción de la apoptosis mediante la activación de la caspasa-3. Una vez corroborado lo anterior, decidimos evaluar el efecto de la expresión de la proteína LC en las células tumorales SKOV3. A pesar de que estas células expresan el doble de la cantidad de survivina en comparación con CrFK, encontramos que la proteína LC tiene la capacidad de inducir cambios morfológicos en aproximadamente del 60% del total de las células transfectadas y se redujo la viabilidad celular en aproximadamente del 60%. Estos datos nos indican que la proteína LC es capaz de inducir la muerte celular de SKOV3 con una eficiencia semejante a la que se observa en las células CrFK; sin embargo, la concentración del plásmido pAmCyan-LC utilizado fue de 5  $\mu\text{g}$  y no de 3.5  $\mu\text{g}$  como lo reporta Barrera-Vázquez- y colaboradores (2019). Asimismo, la expresión de LC en células SKOV3 se comportó de manera similar a lo observado en las células CrFK con respecto al cambio en la morfología, la reducción de la viabilidad celular e inducción de apoptosis. Experimentos que nos permitan mejorar la cantidad de LC expresada por célula y el número de células transfectadas podrían incidir en obtener un mayor porcentaje de muerte celular.

Se ha propuesto que survivina es un buen blanco terapéutico para tratar el cáncer de ovario (Altieri, 2003b; Li et al., 2018) y otros como el de tiroides (Werner et al., 2017) o carcinoma oral de células escamosas (Yan et al., 2017) debido a que su degradación potencializa el efecto de fármacos antineoplásicos como cisplatino. Estos inhibidores como el YM155 ya se encuentra en etapas clínicas de una gran

variedad de tumores malignos en pacientes (Khan et al., 2017). En este proyecto, la proteína LC induce la degradación de survivina en células SKOV3; sin embargo, se tiene la referencia por parte de nuestro grupo de trabajo que además de degradar a survivina, la proteína LC también es capaz de degradar a X-IAP en células CrFK. X-IAP es una proteína de la familia de las IAPs que junto con survivina favorece la proliferación celular. Se ha demostrado que la inhibición de varias IAPs como X-IAP, c-IAP1 y c-IAP2 tiene un efecto de potenciación en la inducción de muerte celular y reducción de la proliferación de células tumorales de próstata (Gill et al., 2009) y células de cáncer de ovario (Xing et al., 2012). Estudios muy recientes, han demostrado que la degradación de survivina en modelos *in vivo* tiene un impacto en el tratamiento (con fármacos antineoplásicos) y progresión de tumores como de cáncer de ovario (Mak et al., 2017; Wang et al., 2018; Yamamoto et al., 2018), cáncer colorectal (Cai et al., 2015) y cáncer de pulmón (Zhang et al., 2014). El desarrollo de moléculas que tienen la capacidad de inhibir a survivina es de gran importancia, y hoy en día se utilizan vehículos como nanopartículas liposolubles que contienen moléculas para el tratamiento del cáncer como el paclitaxel y anti-survivin siRNA; en conjunto, estas nanopartículas tienen la capacidad de integrarse a las células tumorales para el posible tratamiento del cáncer (Chen et al., 2017; Van den Brand et al., 2018). Con lo anterior, podríamos sugerir que la proteína LC podría introducirse a las células con este tipo de moléculas que participan como vehículos para tratar no solo el cáncer de ovario, si no cualquier otro tipo de cáncer en el que la expresión de survivina se encuentre elevada.

Datos de este proyecto sugieren que la proteína LC de FCV podría ser una molécula atractiva para continuar con el estudio de su efecto en células SKOV-3 y en otras que sobre expresen a survivina y caracterizar distintas vías de contacto con las células y en un futuro poder probar su efecto en tumores inducidos en modelos animales. Asimismo, es necesario entender el mecanismo por el cual actúa la proteína LC para inducir la muerte celular y además llevar a cabo un modelo *in vivo* que permita entender dicho mecanismo.

## **Conclusión**

Las líneas celulares tumorales SKOV3 y Huh-7 expresan niveles de survivina superiores a las encontradas en la línea celular no tumoral CrFK.

La expresión de LC produce la degradación de survivina y la inducción de apoptosis las células CrFK y en las SKOV3.

## **Perspectivas**

Determinar si la interacción exógena de la proteína recombinante LC de FCV induce apoptosis en las células SKOV3.

Determinar el efecto pro-apoptótico de la proteína LC sobre las células tumorales SKOV3 cultivadas en presencia de líquido ascítico de pacientes.

Evaluar el efecto de la proteína LC en tumores inducidos en ratones desnudos nu/nu como modelo *in vivo*.

## Referencias

Abente, E. J., Sosnovtsev, S. V., Sandoval-Jaime, C., Parra, G. I., Bok, K., & Green, K. Y. (2013). The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *Journal of virology*, *87*(6), 3003-17.

Altieri, D. C. (2003a). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. *24*;22(53):8581-9.

Altieri, D. C. (2003b). Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*. *3*(1):46-54.

Arnt, C. R., & Kaufmann, S. H. (2003). The saintly side of Smac/DIABLO: giving anticancer drug-induced apoptosis a boost. *Cell and Death Differentiation*, *10*, 1118-1120.

Ausserlechner, M. J., & Hagenbuchner, J. (2016). Mitochondrial survivin – a Achilles´ heel in cancer chemoressitance. *Molecular & Cellular Oncology*, *29*;3(2):e1076589.

Barrera-Vázquez, O. S., Cancio-Lonches, C., Hernández-González, O., Chávez-Munguia, B., Villegas-Sepúlveda, N., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). The feline calicivirus leader of the capsid protein causes survivin and XIAP downrgulation and apoptosis. *Virology*, *15*;527:146-158.

Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., Babu, V., Uche, U., Arnold, J. J., Cameron, C. E., & Green, K. Y. (2005). Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of virology*, *79*(4), 2393-403.

Benjamin, A. L., Steele, D., Kirkwood, C. D., & Parashar, U. D. (2016). The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control. *PLoS Medicine*. *13*(4):e1001999

Bok, K., Prikhodko, V. G., Green, K. Y., & Sosnovtsev, S. V. (2009). Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *Journal of virology*. *83*(8):3647-56.

Braný, D., Dvorská, D., Slávik, P., Školka, R., & Adamkov, M. (2017). Survivin and gynaecological tumours. *Pathology Research and Practice*, 213(4):295-300.

Cai, Y., Ma, W., Huang, X., Cao, L., Li, H., Jiang, Y., Lu, N., & Yin, Y. (2015). Effect of surviving on tumor growth of colorectal cancer *in vivo*. *International Journal Clinic and Experimental Pathology*, 1;8(10):13267-72.

Chang, K. O., George, D. W., Patton, J. B., Green, K. Y., & Sosnovtsev, S. V. (2008). Leader of the capsid protein in feline calicivirus promotes replication of Norwalk virus in cell culture. *Journal of Virology*, 82(19):9306-17.

Chen, X., Zhang, Y., Tang, C., Tian, C., Sun, Q., Su, Z., Xue, L., Yin, Y., Ju, C., & Zhang, C. (2017). Co-delivery of paclitaxel and anti-survivin siRNA via redox-sensitive oligopeptide liposomes for synergistic treatment of breast cancer and metastasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 30;529(1-2):102-115.

Cheng, X. J., Lin, J. C., Ding, Y. F., Zhu, L., Ye, J., & Tu, S. P. (2016) Survivin inhibitor YM155 suppresses gastric cancer xenograft growth in mice without affecting normal tissues. *Oncotarget*, 7: 7096-7109.

Cohen, C., Lohmann, C. M., Cotsonis, G., Lawson, D., & Santoianni, R. (2003) Survivin expression in ovarian carcinoma: Correlation with apoptotic markers and prognosis. *Modern Pathology*, 16:574–583.

Consulta en línea Global Cancer Observatory; <https://gco.iarc.fr/today/home>

Consulta en línea, Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. Perfiles oncológicos de los países; <https://www.who.int/cancer/country-profiles/es/>

de la Garza, J. G., Juárez-Sánchez, P., & Meneses-García, A. (2016). Criterios de diagnóstico y clasificación. En; Cáncer de Ovario Epitelial. Clínica Oncológica de Iberoamérica. Gallardo Rincón D. Editora. *PyDESA México*. pp. 27-39.

Dede, M., Gungor, S., Yenen, M. C., Alanbay, I., Duru, N. K., & Haşimi, A. (2006). CA 19-9 may have clinical significance in mature cystic teratomas of the ovary. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16(1):189-93.

Deng, J., Wang, L., Chen, H., Hao, J., Ni, J., Chang, L., Duan, W., Graham, P., & Li, Y. (2016). Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(34):55771–55788.

Devi, G. R. (2006). siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*, 13: 819-829.

Disilvestro, P., & Alvarez-Secord, A. (2018). Maintenance treatment of recurrent ovarian cancer: Is it ready for prime time?. *Cancer Treatment Reviews*. 69:53-65.

Dunajová, L., Cash, E., Markus, R., Rochette, S., Townley, A. R., Wheatley, S. P. (2016). The N-terminus of surviving is a mitochondrial-targeting sequence and Src regulator. *Journal of Cell Science*, 15;129(14):2707-12.

Gallardo-Rincón, D., Espinosa-Romero, R., Muñoz, W. R., Mendoza-Martínez, R., Villar-Álvarez, S., Oñate-Ocaña, L., Isla-Ortiz, D., Márquez-Manríquez, J. P., Apodaca-Cruz, A., & Meneses-García, A. (2016). Epidemiological overview, advances in diagnosis, prevention, treatment and management of epithelial ovarian cancer in Mexico. *Salud Pública de México*, 58(2), 302-308.

Gill, C., Dowling, C., O'Neill, A. J., & Watson, R. W. (2009). Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation.. *Molecular Cancer*. 23;8:39.

Gloss, B. S., & Samimi, G. (2014). Epigenetic biomarkers in epithelial ovarian cancer. *Cancer letters*. 342(2):257–263.

Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1;7(12).

Gupta, D., & Lis, C. G. (2009). Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival - a review of the epidemiological literature. *Journal Ovarian Research*, 9;2:13.

Gutiérrez-Escolano, A. L. (2014). Host-cell factors involved in the calicivirus replicative cycle. *Future Virology*. 9:2, 147-160.

Herod, M. R., Salim, O., Skilton, R. J., Prince, C. A., Ward, V. K., Lambden, P. R., & Clarke, I. N. (2014). Expression of the murine norovirus (MNV) ORF1 polyprotein is sufficient to induce apoptosis in a virus-free cell model. *PLoS One*, *5*;9(3):e90679.

Jaiswal, P. K., Goel, A., & Mittal, R. D. (2015). Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian Journal of Medical Research*, *141*(4):389-97.

Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., & Ledermann, J. A. (2014). Ovarian cancer. *The Lancet*, *11*;384(9951):1376-88.

Kajiyama, H., Suzuki, S., Yoshikawa, N., Kawai, M., Shibata, K., Nagasaka, T., & Kikkawa, F. (2019). Oncologic outcomes after secondary surgery in recurrent clear-cell carcinoma of the ovary. *International Journal of Gynecologic Cancer*. *29*:910-915.

Khan, Z., Khan, A. A., Yadav, H., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2017). Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma. *Cell & Molecular Biology Letters*, *22*:8.

Knauer, S. K., Bier, C., Habtemichael, N., & Stauber, R. H. (2006). The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Reports*, *7*(12):1259-65.

Kobold, S., Hegewisch-Becker, S., Oechsle, K., Jordan, K., Bokemeyer, C., & Atanackovic, D. (2009). Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites?. *Oncologist*. *14*:1242–51.

Ledermann, J. A., & Pujade-Lauraine, E. (2019). Olaparib as maintenance treatment for patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *11*:175883591984975.

Li, D., Hu, C., & Li, H. (2018). Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. *Biomedical reports*, *8*(5), 399-406.

Mak, C. S., Yung, M. M., Hui, L. M., Leung, L. L., Liang, R., Chen, K., Lui, S. S., Qin, Y., Leung, T. H., Lee, K. F., Chan, K. K., Ngan, H. Y., & Chan, D. W. (2017).

MicroRNA-141 enhances anoikis resistance in metastatic progression of ovarian cancer through targeting KLF12/Sp1/surviving axis. *Molecular cancer*, 17;16(1):11.

Natoni, A., Kass, G. E., Carter, M. J., & Roberts, L.O. (2006). The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *Journal of General Virology*, 87:357-61

Nicholson, D. W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 12;407(6805):810-6.

Plescia, J., Salz, W., Xia, F., Pennati, M., Zaffaroni, N., Daidone, M. G., Meli, M., Dohi, T., Fortugno, P., & Nefedova, Y. (2005). Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell* 7: 457-468.

Ponnusamy, M. P., Venkatraman, G., Singh, A. P., Chauhan, S. C., Johansson, S. L., Jain, M., Smith, L., Davis, J. S., Remmenga, S. W., & Batra, S. K. (2007). Expression of TAG-72 in ovarian cancer and its correlation with tumor stage and patient prognosis. *Cancer letters*, 28;251(2):247-57.

Rathore, R., McCallum, J. E., Varghese, E., Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2017). Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, 22:898-919.

Roane, B. M., Arend, R. C., & Birrer M. J. (2019). Review: Targeting the transforming growth factor-beta pathway in ovarian cancer. *Cancers*, 11(5):668.

Rynne-Vidal, A., Au-Yeung, C. L., Jiménez-Heffernan, J. A., Cremades-Jimeno, L., Bárcena, C., Cristóbal-García, I., Fernández-Chacón, C., Yeung, T. L., Mok, S. C., Sandoval, P., & López-Cabrera, M. (2017). Mesothelial-to-mesenchymal transition as a possible therapeutic target in peritoneal metástasis of ovarian cancer. *The Journal of Pathology*, 242(2):140-151.

Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 20;22(47):7265-79.

Song, Z., Luis, S., He, H., Hoti, N., Wang, Y., Feng, S., & Wu, M. (2004). A single amino acid change (Asp 53 --> Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to proapoptotic. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3):1287-96.

Sosnovtsev, S. V., Garfield, M., & Green, K. Y. (2002). Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *Journal of virology*, 76(14), 7060-72.

Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E. A., Belliot, G., Cohen, J. I., & Green, K. Y. (2003). Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Research*. 94(1):1–10.

Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., & Green, K. Y. (1998). Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *Journal of virology*, 72(4):3051-9.

Sunhueza, C., Wehinger, S., Castillo-Bennett, J., Valenzuela, M., Owen, G. I., & Quest, A. F. (2015). The twisted survivin connection to angiogenesis. *Molecular Cancer*, 19;14:198.

Terada, K. Y., Elia, J., Kim, R., Carney, M., & Ahn, H. J. (2014). Abnormal CA-125 levels in menopausal women without ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 135(1), 34-7.

Terasaki, Y., Terasaki, M., Urushiyama, H., Nagasaka, S., Takahashi, M., Kunugi, S., Ishikawa, A., Wakamatsu, K., Kuwahara, N., Miyake, K., & Fukada, Y. (2013). Role of survivin in acute lung injury: epithelial cells of mice and humans. *Laboratory Investigation*, 93:1147–1163.

Thomson, B. J. (2001). Viruses and apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology*, 82(2):65-76.

Tolcher, A. W., Quinn, D. I., Ferrari, A., Ahmann, F., Giaccone, G., Drake, T., Keating, A., & de Bono J.S. (2012). A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of surviving, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. *Annals of Oncology*, 23(4):968-73.

- Van den Brand, D., Mertens, V., Massuger, L. F. A. G., & Brock, R. (2018). siRNA in ovarian cancer – Delivery strategies and targets for therapy. *Journal of Control Release*, 10;283:45-58.
- Wang, B., Li, X., Zhao, H., Yan, H., Dong, P., Watari, H., Sims, M., Li, W., Pfeffer, L. M., Guo, Y., & Yue, J. (2018). miR-203 inhibits ovarian tumor metastasis by targeting BIRC5 and attenuating the TGF- $\beta$  pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 21;37(1):235.
- Werner, T. A., Dizdar, L., Nolten, I., Riemer, J. C., Mersch, S., Schütte, S. C., Driemel, C., Verde, P. E., Raba, K., Topp, S. A., Schott, M., Knoefel, W. T., & Krieg, A. (2017). Survivin and XIAP - two potential biological targets in follicular thyroid carcinoma. *Scientific Reports*. 7:11383.
- Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76–79.
- Xing, J., Jia, C. R., Wang, Y., Guo, J., & Cai, Y. (2012). Effect of shRNA targeting survivin on ovarian cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138:1221–1229.
- Xu, Y., Fang, F., Ludewing, G., Jones, G., & Jones, D. (2004). A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA and Cell Biology*, 23(9):527-37
- Yamamoto, M., Suzuki, S., Togashi, K., Sanomachi, T., Seino, S., Kitanaka, C., & Okada, M. (2018). AS602801, an anticancer stem cell candidate drug, reduces survivin expression and sensitizes A2780 ovarian cancer stem cells to carboplatin and paclitaxel. *Anticancer research*, 38(12):6699-6706.
- Yan, X., & Su, H. (2017). YM155 Down-regulates survivin and induces P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA)-dependent in oral squamous cell carcinoma cells. *Medical Science Monitor*, 23:1963–1972.
- Zaffaroni, N., Pennati, M., & Daidone, M. G. (2005). Survivin as a target for new anticancer interventions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(2):360-72.

Zhang, K., Li, Y., Liu, W., Gao, X., & Zhang, K. (2015). Silencing surviving expression inhibits the tumor growth of non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports*. 11(1):639-44.

## Abreviaturas

°C	grados Celsius
APAF-1	factor-1 activador de la proteasa apoptótica
CDKs	ciclinas dependientes de cinasas
COE	cáncer de ovario epitelial
DNA	ácido desoxirribonucleico
FCV	calicivirus felino
FGF- $\beta$	factor de crecimiento fibroblástico beta
hp	horas post-transfección
hpi	horas post-infección
HuNoV	norovirus humano
IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
Kb	kilo bases
kDa	kilo daltones
LC	Líder de la cápside
min	minutos
mm	milímetros
mL	mililitros
MNV	Norovirus murino
MOI	Multiplicidad de infección
ng	nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marco de lectura abierto
PARP	poli ADP-ribosa
pb	pares de base
RNA	ácido ribonucleico
TGF- $\alpha$	factor de crecimiento transformante alfa
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante beta
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
WHO	World Health Organization
$\mu$ g	microgramos

$\mu\text{L}$

microlitros