



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

TESIS

**MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DE LA HISTONA 3
ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA DEFENSINA γ -
TIONINA (*Capsicum chinense*) SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE
MAMA**

QUE PRESENTA:

LGA. MARÍA TERESA ARCEO MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA**

ASESOR:

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

COASESORA:

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICH., MAYO DE 2018



El presente proyecto se realizó en las instalaciones del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la coasesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto 14.5) y del CONACyT (proyecto CB-2013-221363) y la beca CONACYT número 598581.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco el apoyo de CONACYT al apoyarme económicamente para la realización de este proyecto, mediante la beca número 598581 y el proyecto CB-2013-221363. Agradezco también el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH con el proyecto 14.5.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1 Cáncer	4
2.1.1 Relevancia del cáncer a nivel mundial.....	4
2.1.2 Características de las células cancerosas.....	6
2.1.3 Importancia de la apoptosis en la carcinogénesis	9
2.2 Cáncer de mama.....	11
2.2.1 Papel de los estrógenos en el cáncer de mama.....	11
2.3 Epigenética y su relación con el cáncer	14
2.3.1 Modificaciones covalentes de las histonas asociadas a cáncer	16
2.3.2 Modificaciones de la histona 3 asociadas a cáncer de mama	27
2.3.3 Compuestos naturales como moduladores epigenéticos	27
2.4 Péptidos antimicrobianos como estrategia para el tratamiento del cáncer	29
2.4.1 Defensinas de plantas	32
2.4.2 Mecanismo de acción de las defensinas vegetales citotóxicas	32
2.4.3 Características del AMP γ -tionina de chile habanero.....	34
2.4.4 Antecedentes directos	36
III. JUSTIFICACIÓN.....	39
V. OBJETIVOS	40
5.1 General	40
5.2 Específicos.....	40
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1 Cultivo celular.....	41
6.2 El AMP γ -tionina de chile habanero.....	41

6.3 Ensayo de viabilidad y modo de muerte celular	41
6.4 Extracción de histonas de células MCF-7 tratadas con el AMP γ -tionina.....	42
6.5 Análisis de Western blot.....	43
6.6 Ensayos de expresión génica	43
6.7 Evaluación de la inhibición de HDACs	45
6.8 Análisis estadístico.....	46
VII. RESULTADOS	47
7.1 Evaluación de la modificación H3K9ac en células MCF-7 por el AMP γ -tionina	49
7.1.1 <i>El AMP γ-tionina aumenta los niveles globales de acetilación de la H3K9 en las células MCF-7.....</i>	49
7.1.2 <i>El AMP γ-tionina inhibe la actividad enzimática de las HDACs en células MCF-7</i>	49
7.1.3 <i>El AMP γ-tionina regula la transcripción de HDAC1/2/3 en células MCF-751</i>	
7.1.4 <i>El AMP γ-tionina disminuye la expresión del ARNm del supresor tumoral p53 en células MCF-7</i>	52
7.2 Evaluación de la modificación H3K9me2/3 en células MCF-7 por el AMP γ -tionina	53
7.2.1 <i>El AMP γ-tionina aumenta los niveles globales de H3K9me2, pero no de H3K9me3 en células MCF-7.....</i>	53
7.2.2 <i>El AMP γ-tionina disminuye en función del tiempo la transcripción de la histona desmetilasa KDM4A en células MCF-7.....</i>	56
7.2.3 <i>El AMP γ-tionina disminuye en función del tiempo la transcripción del receptor de estrógenos α en células MCF-7</i>	57
7.2.4 <i>El AMP γ-tionina disminuye la transcripción de la ciclina D1 pero no de p21 en células MCF-7</i>	58
7.3 Evaluación de la modificación H3S10fos en células MCF-7 por el AMP γ -tionina	59
7.3.1 <i>El AMP γ-tionina no regula la fosforilación de H3S10 en células MCF-7..</i>	59
7.3.2 <i>El AM P γ-tionina regula diferencialmente la transcripción de la cinasa Aurora B en células MCF-7</i>	61

VIII. DISCUSIÓN.....	62
IX. CONCLUSIONES.....	69
X. REFERENCIAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<i>Antecedentes</i>	
Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial de acuerdo a los tipos de cáncer.	5
Figura 2. Incidencia de los tipos de cáncer más comunes en México.....	5
Figura 3. Vías de activación de apoptosis.....	11
Figura 4. Vía de señalización genómica de respuesta a estrógenos en células epiteliales.....	13
Figura 5. Diferentes niveles de regulación epigenética	16
Figura 6. Regulación transcripcional mediada por las modificaciones de histonas	18
Figura 7. Modificaciones específicas de histonas presentes en células cancerosas en relación a su función celular.....	19
Figura 8. Modificaciones covalente de la histona 3 y sus enzimas modificadoras.	26
Figura 9. La defensina γ -tionina de chile habanero.....	35
Figura 10. Citotoxicidad de la defensina γ -tionina en células MCF-7, CEMB y PBMC.....	37
Figura 11. Regulación de la expresión de genes vinculados con apoptosis en células MCF-7 por la defensina γ -tionina.	38
<i>Resultados</i>	
Figura 12. Efecto citotóxico del AMP γ -tionina sobre las células MCF-7.....	48
Figura 13. El AMP γ -tionina aumenta los niveles globales de acetilación de la H3K9 en células MCF-7.....	50
Figura 14. Evaluación de la inhibición de la actividad enzimática de HDACs por el AMP γ -tionina en células MCF-7.....	51
Figura 15. Niveles relativos de expresión génica de HDAC1/2/3 en células MCF-7 expuestas al AMP	52

Figura 16. Niveles relativos de expresión génica de p53 en células MCF-7 expuestas al AMP 53

Figura 17. El AMP γ -tionina aumenta los niveles globales de H3K9me2 pero no de H3K9me3 en células MCF-7. 55

Figura 18. Niveles relativos de expresión génica de KDM4A en células MCF-7 expuestas al AMP 56

Figura 19. Niveles relativos de expresión génica de Esr1 en células MCF-7 expuestas al AMP 57

Figura 20. Niveles relativos de expresión génica de ciclina D1 y p21 en células MCF-7 expuestas al AMP 58

Figura 21. El AMP γ -tionina no regula la fosforilación de la H3S10 en células MCF-7. 60

Figura 22. Niveles relativos de expresión génica de AURKB en células MCF-7 expuestas al AMP 61

Discusión

Figura 23. Modelo de integración de la regulación epigenética de las marcas H3K9ac y H3K9me2 asociadas a la citotoxicidad del AMP γ -tionina en células MCF-7. 68

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<i>Antecedentes</i>	
Tabla 1. Clasificación de las HDACs.	21
Tabla 2. Inhibidores de las HDACs (HDACi) en fase clínica.....	22
Tabla 3. Clasificación de las KDMs.	23
Tabla 4. Principales cambios relacionados con las modificaciones de la histona 3 reportados en cáncer de mama.	27
Tabla 5. Ejemplos de compuestos naturales que han mostrado actividad como moduladores epigenéticos.	28
Tabla 6. Ejemplos de péptidos antimicrobianos que han mostrado efecto citotóxico contra líneas celulares de diferentes tipos de cáncer a través de modos de acción diversos.....	31
Tabla 7. Ejemplos de defensinas de origen vegetal que han mostrado citotoxicidad en células de cáncer	33
 <i>Materiales y métodos</i>	
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en este estudio para realizar los ensayos de expresión génica.....	45

RESUMEN

La importancia de las modificaciones epigenéticas en las histonas, en particular aquellas vinculadas a la histona H3, se ha reconocido en varias etapas de la progresión de tumores de muchos tipos de cáncer, incluido el de mama. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que el péptido antimicrobiano (AMP) γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) induce apoptosis en células cancerosas de mama MCF-7 a través de la regulación de genes pro-apoptóticos, pero se desconoce su participación como modulador epigenético. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar las modificaciones epigenéticas en la histona H3 (H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos) asociadas a la actividad citotóxica del AMP γ -tionina sobre células MCF-7 de adenocarcinoma mamario. Los resultados mostraron un incremento significativo en la marca de acetilación H3K9ac a las 24 h en las células expuestas al AMP γ -tionina ($IC_{50}=117.29 \mu\text{g/ml}$), respecto al vehículo (DMSO 0.5%). Aunado a ello, se observó una inhibición del 40 % de la actividad de las HDACs después de 6 h de tratamiento con el péptido. Asimismo, la expresión de HDAC1/2/3 se redujo de forma dependiente del tiempo. Interesantemente, se encontró un incremento de la marca H3K9me2, así como un decremento en la expresión del ARNm de la histona desmetilasa KDM4A y del receptor de estrógenos α *Esr11*, lo cual sugiere una interacción entre esta modificación y la respuesta a estrógenos. Adicionalmente, se observó una disminución en la transcripción de la ciclina D1, un gen blanco del receptor de estrógenos α . Por el contrario, el nivel de H3S10fos no se vio alterado. En conjunto, los resultados sugieren que el AMP γ -tionina modifica los niveles globales de H3K9ac y H3K9me2/3 y regula la expresión génica de diversas enzimas relacionadas a estas modificaciones, lo cual puede estar relacionado con su efecto apoptótico sobre células MCF-7. Este es el primer trabajo que evalúa el mecanismo citotóxico de un AMP vegetal a nivel epigenético.

Palabras clave: Apoptosis, H3K9ac, H3K9me2, Expresión génica, MCF-7.

ABSTRACT

Importance of epigenetic modifications of histones, especially those of H3 histone, have been recognized in all of the stages of many types of cancer (ca. breast cancer). Previous work of our lab showed that the antimicrobial peptide (AMP) γ -thionin is cytotoxic for breast cancer cells MCF-7 through the regulation of apoptotic genes; however, the epigenetic regulation involved in this mechanism is unknown. Therefore, the aim of this work was to characterize the epigenetic modifications H3K9ac, H3K9me2/3 and H3S10fos associated to cytotoxic activity of AMP γ -thionin in MCF-7 breast cancer cells. Data showed that γ -thionin IC₅₀ 117.29 μ g/ml increased H3K9ac mark after 24 h of treatment. Additionally, this AMP showed significant inhibitory activity against HDAC at 6 h of treatment. Further, the mRNA expression of desacetylases HDAC1/2/3 decreased after 24 h of treatment. Also, the level of H3K9me2 was increased while the expression of histone demethylase KDM4A and the α -estrogen receptor gene (*Esr1*) decreased at 24 h of treatment. This suggest an interplay between this modification and the hormone response. Interestingly, the expression of α -estrogen receptor target gene cyclin D1 was diminished. Nevertheless, H3S10ph was unchanged in all times. Taken together, these results show that AMP γ -thionin induces changes in the global levels of H3K9ac and H3K9me2/3 and regulates genetic expression of diverse epigenetic enzymes related to these modifications which could be associated with apoptotic effect of γ -thionin on MCF-7 breast cancer cells. This is the first study of a plant AMP inducing cytotoxicity through epigenetic mechanisms.

I. INTRODUCCIÓN

El correcto funcionamiento de los tejidos depende de mecanismos estrechamente relacionados con la proliferación y diferenciación celular. La expresión de genes involucrados en estos procesos controla las funciones celulares normales por lo que su regulación fallida, a causa de alteraciones genéticas o epigenéticas, está relacionada con el cáncer (Allegrucci et al., 2011). El cáncer es un término general que se refiere a más de 100 enfermedades diferentes, las cuales se caracterizan por presentar proliferación descontrolada de las células como resultado de mutaciones genéticas heredadas o inducidas por el ambiente, particularmente en los genes supresores de tumores y proto-oncogenes (Jones y Baylin, 2007). Las mutaciones genéticas implican cambios en la secuencia de bases del ADN, mientras que las alteraciones epigenéticas involucran la cooperación de múltiples factores como la participación de pequeños ARNs no codificantes, la metilación del ADN y las modificaciones covalentes de las histonas; estos cambios también se caracterizan por su heredabilidad y susceptibilidad a las influencias ambientales (Holliday, 2006).

La importancia de las modificaciones epigenéticas, en particular, el silenciamiento inapropiado de genes supresores de tumores y la alteración en los patrones de expresión de proto-oncogenes, se ha reconocido en todas las etapas de la progresión de tumores de muchos tipos de cáncer, incluidos el de mama, el de colon y el cervicouterino (Jones y Baylin, 2007). En el cáncer de mama han sido reportados más de 100 genes anormalmente metilados en las islas CpG, los cuales juegan un papel sustancial en la regulación del ciclo celular, apoptosis, metástasis, angiogénesis y señalización hormonal. La presencia de citosinas metiladas está ligada a modificaciones epigenéticas de la histonas particularmente en la histona H3, como la acetilación y metilación de H3K9 así como la fosforilación de H3S10. Estas se han vinculado a procesos de muerte celular debido a su participación en la regulación transcripcional.

Con base en ello, en las últimas décadas los mecanismos epigenéticos identificados en el desarrollo embrionario y en el cáncer han ayudado a entender aspectos básicos de los eventos moleculares que suceden en enfermedades crónicas, por lo que se han dirigido esfuerzos a la generación de conocimientos profundos que permitan diseñar mejores estrategias de tratamiento, mediante el uso de fármacos más específicos y con menores efectos colaterales (Valdespino-Gómez y Valdespino-Castillo, 2012).

En la actualidad, se ha reportado el uso de diferentes productos naturales como estrategia potencial para el tratamiento del cáncer, entre éstos se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés). Los AMPs, además de ejercer actividad contra bacterias y hongos (Gaspar et al., 2013), constituyen una novedosa familia de agentes citotóxicos, anticancerosos e inmunomoduladores que poseen numerosas ventajas frente a las terapias convencionales (Guzmán-Rodríguez et al., 2014). Entre éstas se encuentran su toxicidad y especificidad hacia células tumorales, bajo efecto tóxico en células normales (Xiao et al., 2015), rápida síntesis y capacidad para modificarse y dirigirse (Boohaker et al., 2012). Interesantemente, asociado a la citotoxicidad que presentan estas moléculas en células cancerosas, se ha visto un efecto en la regulación y expresión de genes relacionados con la apoptosis y el ciclo celular. En este sentido, las modificaciones epigenéticas de la histonas cobran gran relevancia. Por ejemplo, el incremento global de acetilación en diferentes residuos de la histona 3, como H3K9, se ha vinculado con ambas vías de apoptosis debido al aumento en la expresión de factores pro-apoptóticos (Alzoubi et al., 2016). La metilación de H3K9 así como la fosforilación de H3S10 también han sido reportadas en la activación de la expresión de genes relacionados con apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7 (Simboeck et al., 2010). Actualmente no existen reportes que evalúen el mecanismo de acción de los AMPs a nivel epigenético. Sin embargo, la lunasina, un péptido bioactivo de la soya, citotóxico contra células cancerosas, presentó efecto a nivel epigenético al inhibir la actividad de las enzimas Histona acetiltransferasas (HATs) (Lumen, 2005).

A este respecto, las plantas representan una fuente de AMPs con potencial terapéutico, ya que se tienen identificadas 3 familias de AMPs de plantas que presentan actividad antimicrobiana y citotóxica: los ciclótidos, las tioninas y las defensinas. Dentro de estas últimas, se encuentra la defensina γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*), la cual mostró citotoxicidad hacia células de cáncer cervicouterino HeLa (Anaya-López et al., 2006). Además, recientemente se reportó su efecto citotóxico en células cancerosas de mama MCF-7 y presentó un incremento en la expresión de genes relacionados con apoptosis (Guzmán-Rodríguez, 2016). Asimismo, este AMP tiene también un efecto inmunomodulador en tejido mamario bovino (Díaz-Murillo et al., 2016). No obstante, se desconoce su participación como modulador epigenético, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar las modificaciones epigenéticas H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos asociadas a la actividad citotóxica del AMP γ -tionina sobre células MCF-7 de adenocarcinoma mamario.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

2.1.1 Relevancia del cáncer a nivel mundial

La Sociedad Americana del Cáncer (2013) define a éste como un término que comprende varias enfermedades caracterizadas por una disfunción en la homeostasis celular que conlleva a la replicación y crecimiento sin control de células que generan una masa multicelular capaz de invadir diferentes partes del cuerpo. Estas enfermedades han marcado la historia clínica de la humanidad desde tiempos remotos, y actualmente han cobrado gran relevancia en la investigación médica y científica a causa del incremento constante en los índices de incidencia y mortalidad.

De acuerdo con el proyecto de estimación de incidencia y mortalidad en cáncer (GLOBOCAN 2012), cada año surgen en el mundo 14.1 millones de nuevos casos; además, se registran 8.2 millones de muertes y existen 32.6 millones de personas viviendo con este padecimiento (con 5 años desde el diagnóstico) alrededor del mundo; se estima que para el 2025 la cifra aumente a 20 millones de casos de cáncer por año. Asimismo, en el 2012 el tipo de cáncer más común fue el de mama, con una incidencia global mayor a 40,000 casos por cada 100,000 casos, seguido por aquellas neoplasias que se dan en los tractos reproductivos (próstata en el caso de hombres y cervicouterino en mujeres), colorrectal y de pulmón; este último presentó el mayor índice de mortalidad, el cual casi alcanzó las 20,000 defunciones (Figura 1). En el caso de México, las cifras son muy similares, ocupando el cáncer de mama el primer puesto con prevalencias de hasta 13.8%, seguido por el de próstata y cervicouterino (Figura 2).

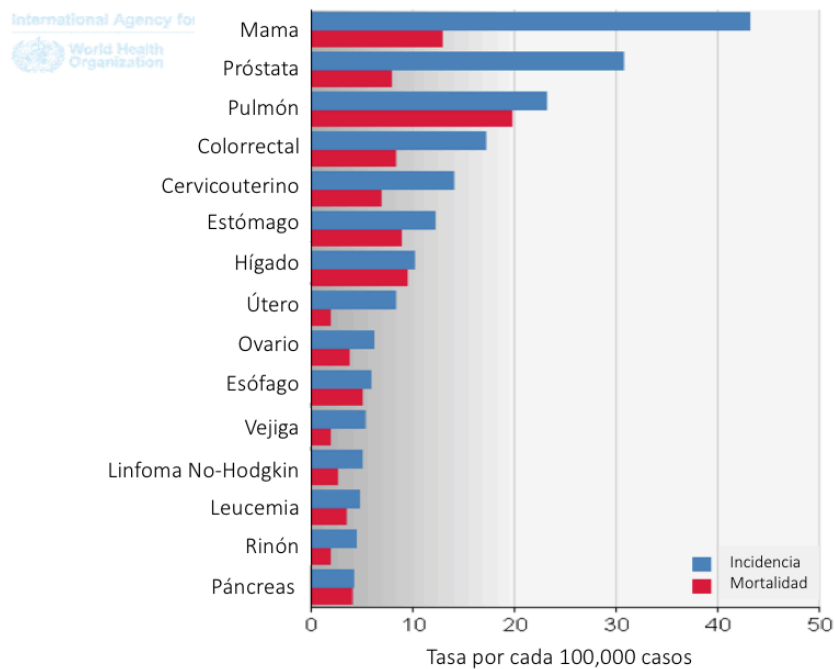


Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad a nivel mundial de acuerdo a los diferentes tipos de cáncer. Los datos se expresan en tasa por cada 100,000 casos. Tomado de GLOBOCAN (2012).

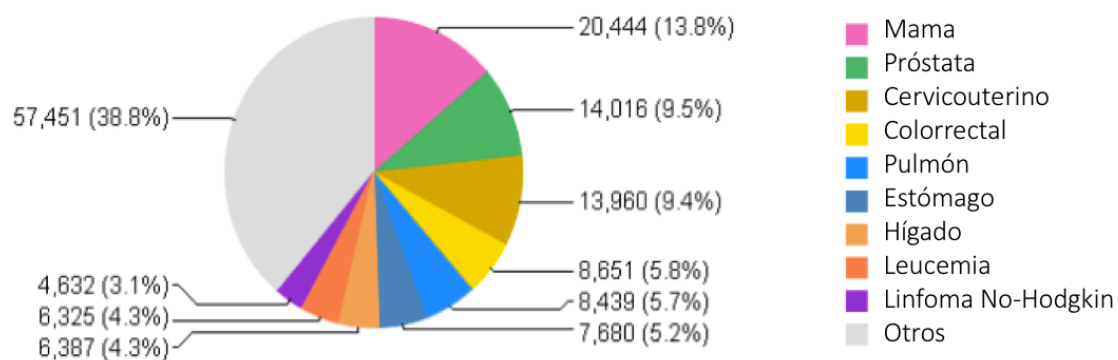


Figura 2. Incidencia de los tipos de cáncer más comunes en México. Tomado de GLOBOCAN (2012).

De forma general, la alta incidencia de cáncer se debe a la complejidad de factores de riesgo que propician su aparición, ya que los datos varían notablemente entre diferentes sectores de la población clasificados por género, edad, región y en particular, por el estilo de vida. Estos factores propician la acumulación de mutaciones en la célula que finalmente desencadenan la enfermedad gracias a una serie de características que las distinguen de las células normales (Alberts et al., 2015).

2.1.2 Características de las células cancerosas

Para que la formación de un tumor pueda llevarse a cabo las células cancerosas rompen o ignoran los controles de su entorno, permitiéndoles proliferar competitivamente contra las células circundantes. Para ello, reúnen una serie de características clave que permiten su crecimiento y el subsecuente desarrollo de la enfermedad (Alberts et al., 2015), las cuales se describen a continuación:

a) Alteración en el metabolismo de la glucosa

El crecimiento de un tumor requiere una cantidad elevada de nutrientes para satisfacer sus necesidades anabólicas, ya que su ritmo de crecimiento es más similar al de un embrión en crecimiento que al de un tejido adulto (Heiden, Cantley, y Thompson, 2009). Para ello, requieren importar mucha más glucosa a partir del flujo sanguíneo que una célula normal. Sin embargo, aún en presencia de oxígeno, sólo una pequeña fracción de ésta se envía a fosforilación oxidativa para la producción de ATP, mientras que cerca del 85% se desvía a la producción de lactato para generar poder reductor (NADPH), destinado a la construcción de biomoléculas que le permitan proseguir con su rápido crecimiento (Liberti y Locasale, 2016). A dicha alteración se le conoce como efecto Warburg (Sancho et al., 2016).

b) Crecimiento descontrolado

En los tejidos normales existe un control cuidadoso en la producción y transducción de señales promotoras de crecimiento que indican la entrada y

progresión del ciclo celular. En contraste, las células tumorales adquieren la capacidad de mantener activa una señal de proliferación mediante diferentes vías: 1) A través de la producción constante de factores de crecimiento o 2) por medio del incremento de receptores de factores de crecimiento en la superficie de las células (Hanahan y Weinberg, 2011). En este sentido, ambas vías pueden derivar en la unión constante de ligandos a receptores de crecimiento, así como en defectos en el funcionamiento de proteínas reguladoras del ciclo celular, principalmente aquellas que se encuentran involucradas en la ruta de MAP-kinasas (Fox y MacFarlane, 2016).

c) Inmortalización

Es ampliamente aceptado que las células tumorales requieren de un potencial de proliferación ilimitado. Esta capacidad difiere en gran medida del comportamiento normal de una célula, la cual tiene un número limitado de divisiones celulares debido al acortamiento de los telómeros, entre otros factores. Los telómeros se componen de largas regiones de ADN repetitivo cuya función es proteger los extremos de los cromosomas (Meyerson et al., 1997). Acorde a ello, la longitud de los telómeros va disminuyendo en cada ciclo de división, por lo que llega un momento en el que pierde su función protectora y desencadena la entrada en crisis de la célula, mediante senescencia o apoptosis (Kailash et al., 2006). Por el contrario, múltiples evidencias muestran que las células cancerosas se immortalizan gracias a una alta actividad de la telomerasa, la cual es la polimerasa responsable de agregar segmentos de ADN telomérico al final de los cromosomas y cuya expresión es casi insignificante en células normales (Fischer y Schulze-Osthoff, 2005). Con relación a ello, las células tumorales también pueden regenerar sus telómeros mediante un mecanismo alternativo llamado ALT, basado en la recombinación homóloga. Eventualmente, estos procesos le permiten a la célula dividirse ilimitadamente y escapar a la muerte y senescencia celular (Lecot et al., 2016).

d) Metástasis

Las células cancerosas tienen la capacidad de moverse y establecerse en otros tejidos del cuerpo diferentes al de su origen, lo que se conoce como metástasis, siendo esta la característica responsable de cerca del 90% de muertes por cáncer (Seyfried y Huysentruyt, 2013).

La cascada de intrusión metastásica ocurre por una sucesión de cambios celulares que comienza con la invasión local seguida por la entrada de las células cancerosas en los vasos sanguíneos y linfáticos circundantes. Posteriormente, éstas transitan a través del sistema circulatorio y linfático hasta extravasarse en el parénquima de tejidos distantes. El establecimiento de un nuevo tumor inicia con la formación de un pequeño nódulo celular que al crecer culmina con el proceso de colonización (Bardelli et al., 2003). Aunque los cambios moleculares asociados a la invasión por metástasis no están del todo dilucidados, el proceso metastásico requiere la intervención de proteínas que alteren los mecanismos de cohesión entre células adyacentes y con la matriz extracelular (Hanahan y Weinberg, 2011).

e) Inducción de angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, las células cancerosas necesitan un sistema que les permita adquirir nutrientes y oxígeno, y liberar desechos y bióxido de carbono (CO₂), por lo que la generación de un nuevo sistema vascular que se interiorice en tejido epitelial vecino permite a los tumores cubrir esa necesidad, proceso conocido como angiogénesis (Nishida et al., 2006). Los vasos sanguíneos producidos durante la oncogénesis muestran diferencias aberrantes respecto a los vasos sanguíneos del resto del cuerpo, tales como la formación de ramificaciones excesivas y complejas, capilares distorsionados y alargados, un flujo sanguíneo descontrolado, microhemorragias y niveles anormales de proliferación de células endoteliales. Con base en ello, se puede explicar el rápido desarrollo de los tumores (Hanahan y Weinberg, 2011).

d) Evasión de mecanismos apoptóticos

La apoptosis sirve como una barrera natural contra la aparición de cáncer; no obstante, cuando se ve alterada la célula es incapaz de regular su ciclo celular mediante la inducción de muerte, dando origen al cáncer.

2.1.3 Importancia de la apoptosis en la carcinogénesis

La apoptosis es un modo de muerte celular programada responsable de la regulación poblacional de células en tejidos normales. Se caracteriza principalmente por no presentar inflamación, ya que se da en células individuales y no en conjuntos de éstas (Fischer & Schulze-Osthoff, 2005). Los cambios morfológicos tempranos que ocurren durante la apoptosis son la compactación y segregación de la cromatina nuclear con la generación de masas granulares que se orillan hacia la envoltura nuclear y propician la condensación del citoplasma. Esto es seguido del rompimiento del ADN en fragmentos discretos que se rodean en una doble membrana y producen cuerpos apoptóticos subsiguientemente fagocitados por las células vecinas (Kerr et al., 1994).

Existen dos vías de señalización para inducir apoptosis: extrínseca e intrínseca. En la primera, la muerte celular es activada por receptores transmembranales pertenecientes a la familia de los TNF (Tumor necrosis factor) y el receptor de muerte Fas (Winter et al., 2014). Entre los mecanismos más comunes de la vía extrínseca de apoptosis se encuentra la activación de Fas en la superficie de la célula blanco a través del ligando FasL, que se localiza en la superficie de un linfocito citotóxico (Elmore, 2007). Posteriormente, los dominios de muerte del receptor se unen a proteínas adaptadoras citoplasmáticas como FADD, las que a su vez se unen a caspasas iniciadoras (principalmente la caspasa 8) y forman el complejo DISC (Complejo de señalización inductor de muerte) (Fulda & Debatin, 2006). Una vez que se activaron por medio de la dimerización, las caspasas iniciadoras se rompen para activar a las caspasas efectoras (caspasa 3, 7 o 6) cuya señal finalmente induce apoptosis (Figura 3). En muchos casos, la vía extrínseca requiere señalización adicional intrínseca para

amplificar la cascada de caspasas y matar a la célula (Alberts et al., 2015). Las células del cáncer involucran numerosas estrategias para resistir la muerte celular por vía extrínseca. La señalización de muerte, en respuesta a la unión del receptor con el ligando, puede ser inhibida por un incremento de moléculas anti-apoptóticas o por una disminución de la expresión o disfunción de las proteínas pro-apoptóticas (Zhang y Zhong, 2014). Por ejemplo, en tumores que tienen el receptor Fas silenciado, la restauración epigenética de su expresión a través de inhibidores de histonas desacetilasas resulta en la supresión del crecimiento tumoral y la restauración de la quimiosensibilidad (Fulda y Debatin, 2006).

Por otro lado, en la vía intrínseca la propia célula activa su programa de apoptosis en respuesta al estrés por daño al ADN, a señales ambientales o del desarrollo (Lodish et al., 2013). Esta ruta se dispara por una permeabilización de la membrana externa mitocondrial en respuesta a proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl, las cuales inducen la salida de proteínas, principalmente citocromo c, del espacio intermembranal mitocondrial (Elmore, 2007). Es importante mencionar que existen también proteínas Bcl anti-apoptóticas, como Bcl2, que previenen una apoptosis no deseada gracias al bloqueo que ejercen por medio de su unión con las proteínas pro-apoptóticas (Winter et al., 2014). Posteriormente, el citocromo c activa a la proteína Apaf-1 mediante un cambio conformacional que expone su dominio de unión (CARD) con otras Apaf-1 para formar un anillo de 7 proteínas llamado apoptosoma. Cada dominio CARD recluta una caspasa 9 para activar el apoptosoma. El posterior rompimiento y dimerización de la caspasa 9 activa a las caspasas efectoras (caspasa 3, 7 o 6) y desencadena la apoptosis (Alberts et al., 2015) (Figura 3).

Las mutaciones de los genes involucrados en la regulación de la apoptosis mitocondrial son muy comunes en células de cáncer; por ejemplo, la sobreexpresión de Bcl2 promueve la oncogénesis y se ha demostrado que origina la transformación neoplásica de células mieloides y linfocitos T y B (Fischer y Schulze-Osthoff, 2005). También se han encontrado cambios en los niveles de expresión de esta misma proteína, ya sea un incremento o disminución, en cáncer de ovario, melanoma y leucemia (Bargou et al., 1995). En relación a ello, la

activación de la proteína supresora de tumores p53 mediante su unión a Bcl2 y Bcl-XL afecta directamente la integridad mitocondrial generando la salida de citocromo c y la posterior activación de la apoptosis (Vousden y Lane, 2007).

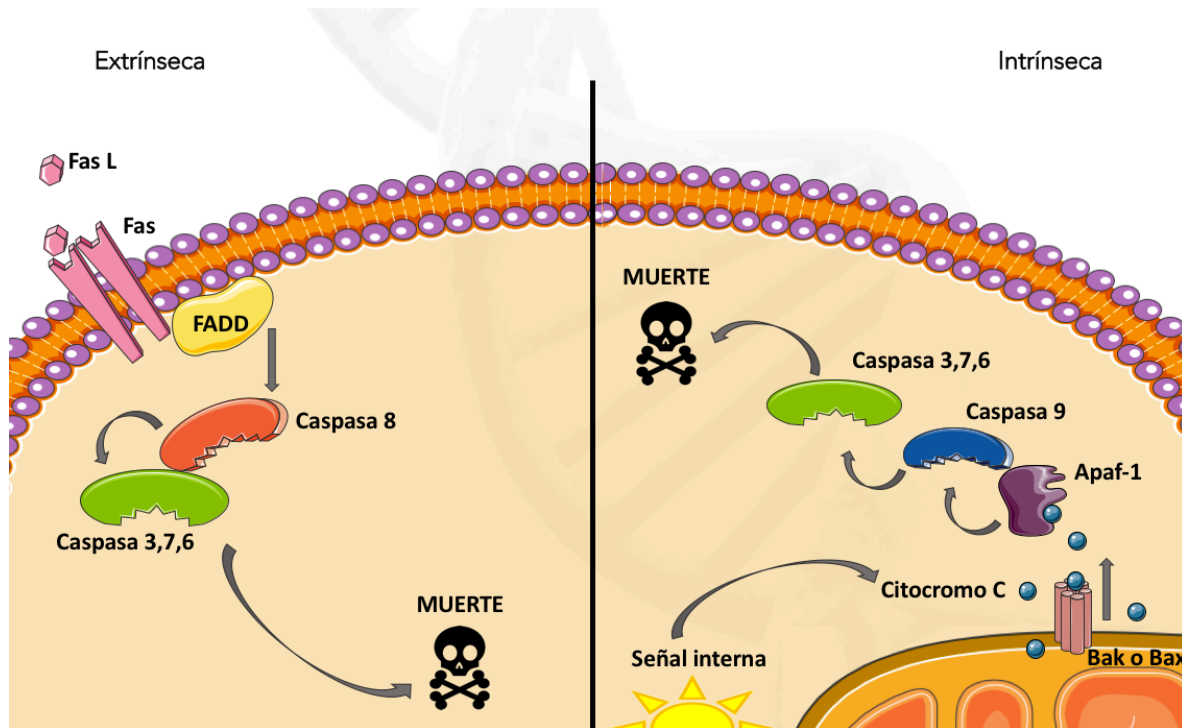


Figura 3. Vías de activación de apoptosis. 1) Extrínseca, a través de ligandos que se unen a receptores en la superficie celular. 2) Intrínseca, que se activa ante la salida de moléculas de la mitocondria. Adaptado de Lodish et al. (2013).

2.2 Cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente, en México, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres (INEGI, 2015) y se estima que cerca del 80% son Receptor de estrógenos positivos (ER+), mientras que el 20 % restante son ER-, por lo cual es importante considerar la importancia de los estrógenos en el desarrollo y tratamiento de esta neoplasia (Lumachi et al., 2015).

2.2.1 Papel de los estrógenos en el cáncer de mama

Los estrógenos son hormonas esteroideas derivadas del colesterol, cuya función se relaciona principalmente con el desarrollo sexual femenino. La actividad estrogénica en la edad reproductiva de la mujer se debe predominantemente al 17β -estradiol (E2), el cual es derivado de la testosterona gracias a la enzima aromatasa (Heldring et al., 2007).

Los estrógenos inducen diferentes eventos de proliferación celular en órganos pertenecientes al sistema reproductivo y endocrino, como útero, ovario y mama, debido a su unión con receptores intracelulares los cuales son factores de transcripción. En el humano se han identificado dos variantes de estos receptores: el $ER\alpha$, cuya actividad es predominante en los órganos reproductivos, y el $ER\beta$, que es preponderante en el sistema nervioso central, pulmón y colon (Lee et al., 2012).

En el caso particular del E2, se han propuesto dos tipos de respuesta hormonal, la genómica y la no genómica. En la primera, el ligando atraviesa la membrana plasmática y se une a su receptor en el citoplasma. El complejo E2-ER se transloca al núcleo y funciona como factor de transcripción de genes blanco relacionados con la proliferación celular, ya que se une a elementos en cis denominados EREs (Elementos de respuesta a estrógenos) (Figura 4) (Renoir et al., 2013). En la vía no genómica, el ligando puede unirse al receptor y activar la cascada de PI3K/AKT o de las MAP cinasas que desencadenan diferentes rutas de crecimiento celular. De forma alternativa, el E2 puede ser reconocido por receptores del retículo endoplásmico asociados a proteínas G como GPR30, que activa vías como la de PKA y PIP3 (Prossnitz et al., 2007). Las múltiples moléculas efectoras río abajo de la señalización estrogénica pueden ser activadas en un contexto específico y de una manera receptor-selectiva, resultando en una dinámica de modificaciones epigenéticas de histonas, especialmente aquellas que involucran a H3K4, H3K9 y H3K27 (Cooke et al., 2017).

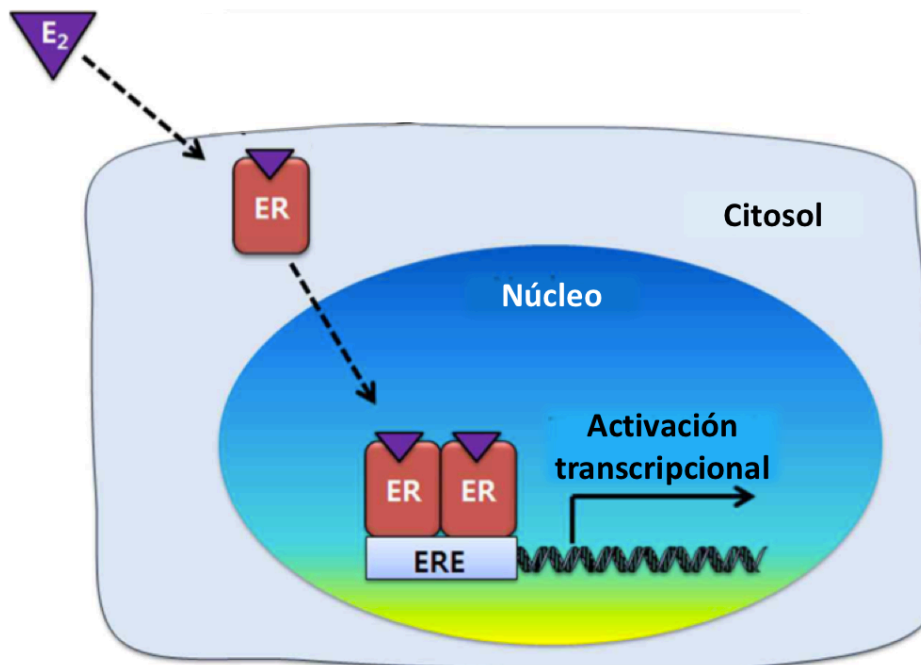


Figura 4. Vía de señalización genómica de respuesta a estrógenos en células epiteliales. El E₂ entra a la célula y se une al ER localizado en el citoplasma. El complejo E₂-ER se transloca al núcleo y funciona como factor de transcripción en elementos *cis* denominados ERE, los cuales se localizan en genes blanco del E₂-ER. E₂: Estradiol, ER: Receptor de estrógenos, ERE: Elementos de Respuesta a Estrógenos. Adaptado de Lee et al. (2012).

Diferentes estudios han documentado la participación de los estrógenos en la aparición y el desarrollo de diversos tipos de cáncer en órganos sexuales, como el de mama y el de ovario. Específicamente, en la glándula mamaria la señalización por estrógenos dirige la formación ductal, así como el desarrollo de ramificaciones y el crecimiento de compartimientos grasos, por lo que a raíz de una serie de factores genéticos y ambientales durante etapas clave del desarrollo, como el embarazo y la menopausia, se puede propiciar el desequilibrio de estas vías de proliferación que conducen a la aparición de un tumor mamario (Lee et al., 2012; Lumachi et al., 2015; Perillo et al., 2014; Perillo et al., 2008).

De forma paralela, la presencia de receptores de estrógenos es determinante para el pronóstico del paciente, ya que influencia en gran medida la malignidad de la enfermedad, así como la capacidad de metástasis y de respuesta a terapias. Los carcinomas ER+ se asocian con un mejor pronóstico, una mayor respuesta en terapias hormonales combinadas y se caracterizan por una

enfermedad atípica con niveles heterogéneos de carcinoma ductal *in situ*. No obstante, la enfermedad puede progresar a un tumor ER-, en el cual las células pierden su grado de diferenciación, lo que propicia un diagnóstico con una baja tasa de respuesta a terapia y un alto riesgo de metástasis debido a la evolución de las lesiones a carcinomas ductales invasivos (Platet et al., 2004).

En función de ello, en el cáncer de mama se han implementado diferentes terapias hormonales agonistas de la síntesis o señalización estrogénica, entre los que se incluyen los inhibidores de aromatasa y el tamoxifeno (bloqueador de ER) (Casillet y Dena, 2004). Asimismo, se ha propuesto el uso de nuevas terapias moleculares que tengan como objetivo componentes clave de la señalización hormonal, entre ellas se cuenta el uso de inhibidores de HDACs y AKT, o bien, el diseño de micro ARNs dirigidos a los mensajeros inducidos por el E2 (Renoir et al., 2013).

2.3 Epigenética y su relación con el cáncer

El término epigenética fue introducido por primera vez en 1942 por Conrad Waddington, como el estudio de las interacciones entre los genes y sus productos que controlan los cambios fenotípicos durante el desarrollo. Con el paso del tiempo, el concepto ha ido evolucionando gracias a las investigaciones científicas, hasta considerarse como “el estudio de los cambios químicos heredables sobre el ADN sin alteración de su secuencia nucleotídica” (Zhang y Pradhan, 2014). Con base en ello, el epigenoma integra la información codificada en el genoma con las pistas químicas y moleculares de su origen celular, extracelular y ambiental, a través de la definición del programa de expresión génica que le otorga su identidad funcional durante el desarrollo o la enfermedad (Kanherkar et al., 2014).

Los eventos epigenéticos son importantes en todos los aspectos de la biología experimental, ya que desde la década pasada se mostró que juegan un papel clave en los procesos de carcinogénesis y la progresión de tumores (Yoo y Jones, 2006). Gracias a ello, se pueden explicar muchas de las propiedades de las células cancerosas que radican principalmente en la regulación errónea de la

expresión génica a nivel de cromatina que resulta en una disfunción celular (Esteller, 2011).

En la Figura 5 se muestran diferentes niveles de regulación epigenética estudiados en cáncer. En el primero se encuentran la metilación del ADN, la cual consiste en la adición de un grupo metil (CH_3 -) en la posición 5 del anillo pirimídico de las citosinas. La metilación de citosinas del ADN se asocia a la presencia de islas de dinucleótidos CpG. Estas islas normalmente están sin metilar, sin embargo, la metilación de éstas provoca un fuerte estado de compactación de la cromatina, lo que dificulta la transcripción y por lo tanto, la expresión génica (Kanherkar et al., 2014).

El segundo nivel lo constituyen las modificaciones covalentes en las histonas, las cuales se detallan en el apartado posterior. En el tercer nivel se encuentran los complejos remodeladores de cromatina, los cuales son complejos proteicos que utilizan ATP para alterar las interacciones entre el ADN y las histonas (Yoo y Jones, 2006). Estas alteraciones pueden incluir deslizamientos de las histonas respecto a su posición original en el ADN; cambios en la composición de histonas del octámero (se puede incluir el cambio de una histona canónica por una variante de histona); o incluso la pérdida parcial o total del octámero (Ajiro et al., 2010). El cuarto nivel de regulación epigenética está conformado por la participación de ARNs no codificantes. Se han reportado micro ARNs que regulan la expresión de genes blanco debido a su unión en regiones 3' no traducidas de ARN mensajeros, lo que resulta en la degradación o inhibición de este (Khan et al., 2012). Adicionalmente, se ha mostrado que algunos ARN largos son capaces de unirse a complejos modificadores de la cromatina y dirigirlos a diferentes regiones genómicas (Léveillé et al., 2015). En el último nivel se encuentra la dinámica nuclear de la cromatina. Las regiones más cercanas a la lámina nuclear tienen poca densidad de genes y baja actividad de transcripción; en las zonas centrales del núcleo se ha encontrado mayor actividad de la expresión génica así como mayor participación de factores de transcripción.

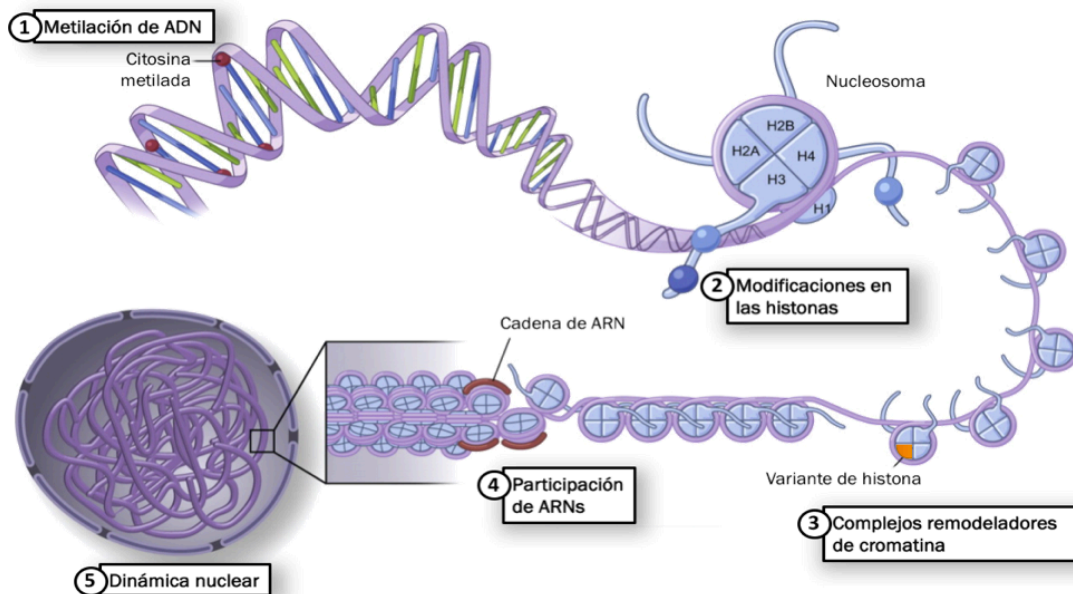


Figura 5. Niveles de regulación epigenética. La regulación epigenética puede darse en varios niveles celulares, que incluyen la metilación del ADN, las modificaciones covalentes en las colas de las histonas, los complejos remodeladores de la cromatina, la participación de ARNs no codificantes y la posición de la cromatina dentro del núcleo. Tomado de Lovrei et al., 2013.

2.3.1 Modificaciones covalentes de las histonas asociadas a cáncer

El nucleosoma representa el primer nivel de organización de la cromatina y se compone de dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, ensamblados en un núcleo octamérico que se rodea por aproximadamente 147 pb de ADN (Zhou et al., 2011).

Las histonas no se consideran simples empaquetadores del ADN, ya que se ha reconocido su función como reguladores dinámicos de la actividad génica a través de sus modificaciones químicas post-traduccionales, principalmente la metilación, acetilación y fosforilación, aunque se han reportado otras modificaciones como la ubiquitinación y sumolización (Esteller, 2007); es por ello que se ha propuesto que las diferentes combinaciones presentadas sobre los extremos N-terminal de las histonas forman un “código de histonas” encargado de regular la actividad genética (Cao et al., 2016). Estas modificaciones influyen el

grado de compactación de la cromatina y permiten su apertura o cierre para exponer al ADN en los procesos de transcripción o reparación (Jin et al., 2010). Por ejemplo, los grupos acetil neutralizan las cargas positivas de las colas de las histonas, lo que debilita la interacción electrostática entre éstas y el esqueleto fosfatado del ADN, permitiendo una separación del ácido nucleico del octámero que facilita el acceso de factores de transcripción. La metilación de las histonas, con excepción de algunas marcas como H3K4me_{2/3}, generalmente se asocia con la compactación de la cromatina confiriéndole un estado de represión transcripcional (Zhang y Pradhan, 2014) (Figura 6). Genómicamente, estas modificaciones pueden tener lugar en las histonas presentes en los promotores, la región codificante del gen (exones), los potenciadores y en la heterocromatina constitutiva (Zhou et al., 2011).

Los patrones de la modificación de histonas también son alterados en los tumores humanos, en particular, las modificaciones de las histonas H3 y H4. Por ejemplo, en la H3 se presenta la acetilación/metilación de la lisina 9 (H3K9ac/me), la di y trimetilación de la lisina 4 (H3K4me_{2/3}) y 27 (H3K27me₃), la acetilación de la lisina 14 (H3K14ac), así como la fosforilación de la serina 10 (H3S10fos) y 28 (H3S28fos); estas modificaciones son reconocidas por complejos lectores que contiene cromodominios y bromodominios, los cuales reconocen lisinas metiladas y acetiladas respectivamente (Esteller, 2011).

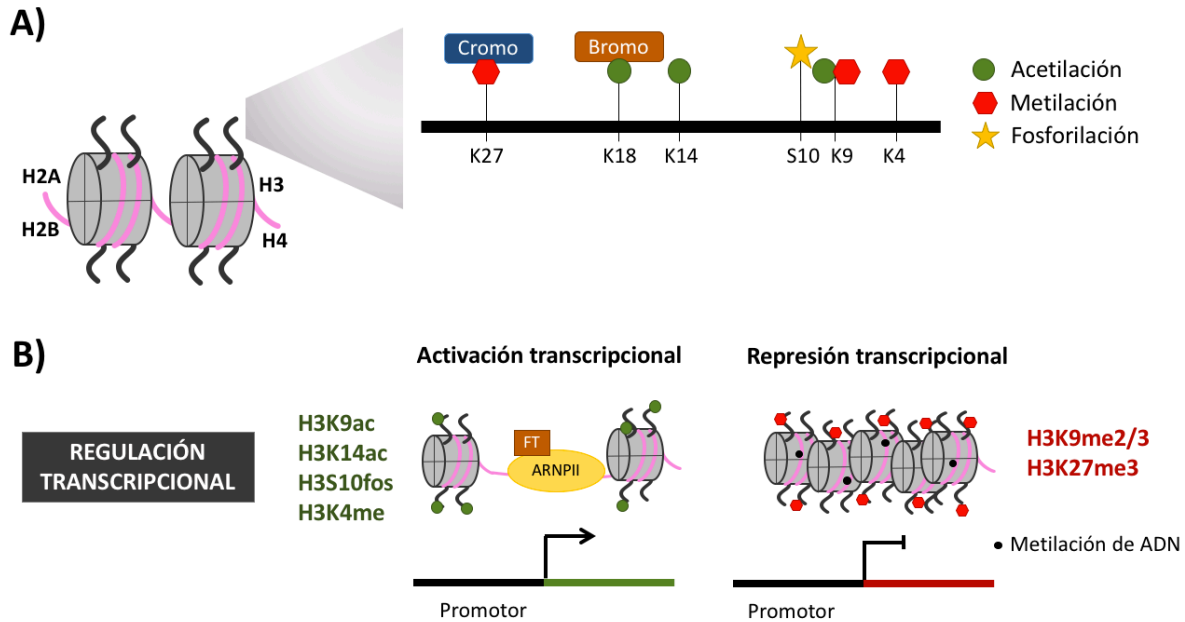


Figura 6. Regulación transcripcional mediada por las modificaciones de las histonas. **A)** En el desarrollo y la progresión del cáncer se ha reconocido la importancia de las modificaciones de las histonas, particularmente de la H3. Entre las principales modificaciones de la H3 está la acetilación, metilación y fosforilación. Las lisinas acetiladas son reconocidas por bromodominios y las metiladas por cromodominios. **B)** Las modificaciones de histonas pueden regular la expresión génica a nivel transcripcional. Se muestran en verde algunas modificaciones de la H3 que confieren un estado de activación transcripcional, ya que relajan la cromatina y permiten la entrada de la maquinaria de transcripción. Las modificaciones en rojo confieren un estado de represión transcripcional, ya que en asociación con marcas de metilación de ADN compactan la cromatina y dificultan la entrada de la maquinaria de transcripción. H3: Histona 3, FT: Factor de transcripción, ARNP II: ARN Polimerasa II. Adaptado de Falkenberg y Johnstone (2014); Zhou et al. (2011).

Los patrones anormales de las modificaciones de histonas tienen consecuencias funcionales que convergen en la regulación errónea de procesos celulares del desarrollo de cáncer implicados en la expresión génica, estabilidad genómica, reparación del ADN y control del ciclo celular (Figura 7) (Füllgrabe, Kavanagh, y Joseph, 2011).

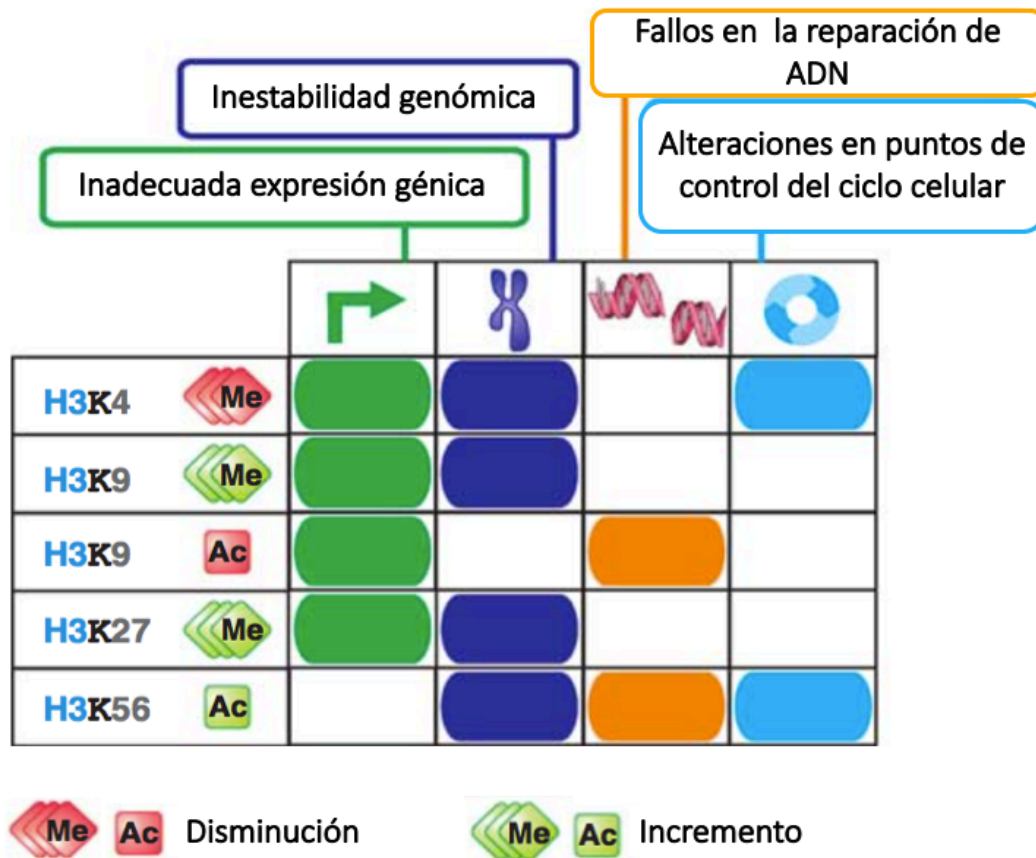


Figura 7. Modificaciones específicas de las histonas presentes en células cancerosas en relación a su función celular. La disminución o incremento anormal de metilación o acetilación en diferentes residuos de la H3 puede ocasionar consecuencias funcionales. Por ejemplo, el incremento de metilación de H3K9 puede ocasionar inadecuada expresión génica e inestabilidad genómica, mientras que la pérdida de acetilación en el mismo residuo puede ocasionar inadecuada expresión génica y fallos en la reparación del ADN. Me: Metilación, Ac: Acetilación, H3: Histona 3. Tomado de Füllgrabe et al. (2011).

Como se mencionó anteriormente, entre las modificaciones de la H3 que se han vinculado a cáncer se encuentran la acetilación y metilación de H3K9 y la fosforilación de H3S10, las cuales se describen a continuación.

a) Acetilación de H3K9

Está bien establecida la importancia de ciertos patrones de modificaciones de histonas en oncogenes y genes supresores de tumores, que funcionan como

marcadores en la progresión de la neoplasia. Por ejemplo, la pérdida de acetilación en H3K56 en el promotor de p300, un regulador de la división y crecimiento celular, se ve implicado en procesos anormales de crecimiento celular (Bannister y Kouzarides, 2011). Asimismo, una disminución de H4K16ac se ha reportado en varios tipos de cáncer, entre ellos el de mama, pulmón y gástrico, y ha mostrado influencia en la sensibilidad de las células cancerosas a la quimioterapia (Lopez et al., 2009; Montenegro et al., 2015; Yoo y Jones, 2006).

Otra marca que ha sido extensamente estudiada en cáncer es la acetilación de H3K9, ya que se ha reportado un incremento de H3K9me3, y por lo tanto una pérdida de su contraparte H3K9ac, en cáncer de próstata, pulmón, hígado, colon y mama (Füllgrabe et al., 2011). La acetilación de histonas se ha visto regulado principalmente por las enzimas modificadoras de histonas, como las HATs (Histona acetiltransferasas) y las HDACs (Histona desacetilasas) (Falkenberg y Johnstone, 2014).

Histona acetiltransferasas (HATs): Para lograr la acetilación de las histonas, las HAT utilizan el acetil CoA como cofactor y catalizan la transferencia de un grupo acetil al grupo amino de las lisinas. Existen 2 grupos: grupo A y B. El grupo A incluye las familias de GNAT, MYST y CBP/P300. El grupo B se caracteriza por tener una secuencia altamente conservada con scHat1, la proteína fundadora de este grupo. Además, se ha observado que las HATs tipo B, acetilan histonas libres y no aquellas que se encuentran organizadas en la cromatina (Bannister y Kouzarides, 2011). En la modificación de H3K9, se ha involucrado la participación de HAT tipo A como P300/CBP y GCN5 (Zhang y Pradhan, 2014).

Histona desacetilasas (HDACs): Las HDACs tienen el efecto contrario a las HATs al revertir la acetilación de las lisinas y condensar nuevamente la cromatina. Para su estudio se dividen en varias clases: La clase I se localiza principalmente en el núcleo y se expresa de manera ubicua. La clase IIa se localiza en el núcleo y citoplasma, mientras que la clase IIb es exclusiva del citoplasma. La HDAC11 es la única de la clase IV y cuya función es aún desconocida (Zhang y Zhong, 2014). Estas clases conforman las HDACs canónicas, que requieren Zinc como cofactor. Existe una clase III de HDACs

llamadas sirtuinas, las cuales son independientes de zinc y utilizan NAD⁺ como cofactor (Geutjes, Bajpe, y Bernards, 2012) (Tabla 1). En el residuo acetilado de H3K9, se ha involucrado principalmente a la HDAC1 y HDAC2, aunque también se ha visto la participación de HDAC3, HDAC4, HDAC6 y HDAC8, entre otras (Zhang et al., 2014).

Tabla 1. Clasificación de las HDACs. Se muestran los miembros de cada clase, así como su localización celular y el cofactor que utilizan para llevar a cabo su actividad enzimática. HDAC: Histona desacetilasa. Adaptado de Zhang y Zhong, 2014, Zhang et al., 2014 y Geutjes et al., 2012.

CLASE	MIEMBROS	LOCALIZACIÓN	COFACTOR
I	HDAC1, 2, 3 y 8	Principalmente núcleo	Zn ²⁺
IIa	HDAC4, 5, 7 y 9	Núcleo y citoplasma	
IIb	HDAC6 y 10	Citoplasma	
IV	HDAC11	Sin determinar	
III	SIRT1, 2, 3, 4, 5 y 6	Núcleo y citoplasma	NAD ⁺

En el cáncer de mama se ha encontrado una disminución generalizada de acetilación en marcas como H3K9, H3K18, H4K16 y H4K12, así como un aumento en la expresión de HDAC1, 3 y 6 (Ceccacci y Minucci, 2016; Jovanovic et al., 2010; Luo et al., 2011). La sobreexpresión de las HDACs también se ha observado en otros tipos de neoplasias, por ej., en el cáncer de colon (Alzoubi et al., 2016) y de próstata (Beaver et al., 2012), por lo que actualmente se han desarrollado inhibidores de las HDACs como terapia blanco para el tratamiento de cáncer, algunos de los cuales ya se han probado en fase clínica (Tabla 2).

Tabla 2. Inhibidores de las HDACs (HDACi) en fase clínica. Se muestra entre paréntesis el nombre comercial. HDAC: Histona desacetilasa. La letra i minúscula indica inhibidor.

COMPUESTO	TIPO	BLANCO	FASE CLÍNICA	REFERENCIA
SAHA (Vorinostat)	Ácido hidroxámico	Pan-HDACs	Aprobado para CTCL desde 2006	Lee et al., 2012
Depsipéptido FK228 (Romidepsina)	Tetrapéptido cíclico	Pan-HDACs	Aprobado para CTCL desde 2009	Zhang y Zhong, 2014
VPA	Ácido graso de cadena corta	Pan-HDACs	Fase III	Dueñas-González et al., 2008
Fenilbutirato de sodio	Ácido graso de cadena corta	HDACs clase I y II	Fase II	Ceccacci y Minucci, 2016
TSA	Ácido hidroxámico	Pan-HDACs	No probado	Boldent et al., 2006
SAHA= Ácido hidroxámico suberoilánilida; VPA= Ácido valproico; TSA=Tricostatina A. CTCL= Linfoma cutáneo de células T.				

b) Metilación de H3K9

La mono, di, y tri metilación de las lisinas en residuos como H3K9, H3K27 y H4K20 se encuentran enriquecidas en zonas de cromatina fuertemente compactadas (heterocromatina) y se asocian con la represión transcripcional, mientras que la metilación de H3K4, H3K36 y H3K79 se han visto mayoritariamente en zonas de cromatina más laxas (eucromatina) y se asocian con la activación transcripcional (Zentner y Henikoff, 2013). La regulación de la metilación de histonas está dada por la participación de HMTs (Histona metiltransferasas) y KDMs (Histona desmetilasas) (Falkenberg y Johnstone, 2014).

Histona metiltransferasas (HMTs): Las HMT generalmente metilan lisinas gracias a un dominio SET o PR, el cual confiere la actividad catalítica. También se les conoce como KMT (Lisina metil transferasas). La familia de las KMT1 incluye a las proteínas pertenecientes a SUV39H y G9a y generalmente metilan H3K9. Las KMT6, también llamadas EZH2 metilan H3K27 y forman parte del conjunto

repressor Polycomb, el cual induce represión aberrante de genes en cáncer. La sobreexpresión de EZH2 está asociada con una enfermedad más agresiva y metastásica en cáncer de mama y próstata (Geutjes et al., 2012).

Histona lisina desmetilasas (KDMs): Durante muchos años la metilación de histonas se consideró como una marca estática, no obstante, en la actualidad se han descrito diferentes mecanismos de des-metilación.

Se conocen dos grupos de KDMs: las KDM1/LSD, que desmetilan lisinas mono y dimetiladas y actúan con FAD como cofactor; y las proteínas Jumonji-C (JmjC), las cuales también actúan sobre residuos trimetilados y utilizan Fe (II) y α -cetoglutarato como cofactores (Bannister y Kouzarides, 2011). La enzima LSD1 desmetila residuos mono y dimetilados de H3K4 y H3K9 y su sobreexpresión se ha asociado con características más agresivas en células de cáncer de mama ER negativo, mientras que en cáncer de mama ER positivo, LSD1 funciona como coactivador del receptor de estrógenos α (Luo et al., 2011). Al grupo de las Jumonji la componen las familias de las KDM2-5 (Geutjes et al., 2012) (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las KDMs. Se muestran algunos miembros de cada grupo, así como el nivel de metilación sobre el que actúan y el cofactor que utilizan KDM: Histona lisina desmetilasa. Adaptado de Bannister y Kouzarides, 2011 y Geutjes et al., 2012.

GRUPO		MIEMBROS	NIVEL DE METILACIÓN	COFACTOR
KDM1/LSD		LSD1, LSD2	Mono y dimetilación	FAD
Jumonji-C	KDM2/JHDM1	KDM2A, KDM2B	Mono, di y trimetilación	Fe ²⁺ y α -cetoglutarato
	KDM3/JMJD1	KDM3A, KDM3B	Mono y dimetilación	
	KDM4/JMJD2	KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM4D	Mono, di y trimetilación	
	KDM5/JARID1	KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D	Di y trimetilación	

En el caso de la des-metilación de H3K9, se han reportado diferentes enzimas borradoras con dominio Jmj-C como KDM4A, KDM4B y KDM3A, las cuales forman parte importante de la regulación epigenética en el cáncer de mama (Wang et al., 2007). La sobreexpresión de JKDM4A y JMJD2A se ha observado en células malignas y también se ha involucrado en la respuesta a daño al ADN (Cao et al., 2016).

c) Fosforilación de H3S10

Al igual que las otras modificaciones, la fosforilación de las histonas es altamente dinámica y es controlada por cinasas y fosfatasas que fosforilan y desfosforilan, respectivamente (Simboeck et al., 2010).

Entre las fosforilaciones más estudiadas se encuentra la fosforilación en la serina 139 de la variante de histona H2AX, ya que se involucra en la reparación del ADN por ruptura de doble cadena y en la contención de la tumorigénesis (Cao et al., 2016). Por otro lado, la adquisición de resistencia a la apoptosis es una característica en las etapas iniciales de todos los tipos de cáncer (Zhang y Zhong, 2014). Estudios recientes indican que la fosforilación de histonas involucradas en la cascada de señalización apoptótica, específicamente en la serina 14 de la histona H2B en el gen *Mst1* (Mammalian sterile twenty), es capaz de disparar la activación de la ruta (Wang et al., 2007). Este gen codifica una cinasa involucrada en la ruptura de caspasas en mamíferos, y su equivalente *Ste20* en levaduras.

Existen otras modificaciones como la fosforilación de la serina 10 (H3S10fos) que han cobrado gran relevancia debido a su participación en procesos como la división celular, en donde se ha observado un incremento de esta marca en líneas celulares altamente proliferativas como consecuencia de una activación constitutiva de las rutas de las MAP cinasas (Khan et al., 2016). La fosforilación de la H3 posee una característica sumamente interesante frente a otras modificaciones, ya que, de forma global, durante la mitosis se asocia con la compactación de cromatina, mientras que, durante la interfase puede conferir un estado de activación transcripcional en respuesta a una señalización extracelular (Sawicka y Seiser, 2012). La escritura de la marca de H3S10fos se lleva a cabo

principalmente por la Aurora cinasa B, aunque se han reportado otras cinasas que modulan la fosforilación en este residuo como MSK1, MSK2 e IKK- α (Lester et al., 2011). Por su parte, las fosfatasas PP1 y PP2A son las encargadas de borrar la marca de fosforilación de H3S10 (Sawicka y Seiser, 2012).

En la figura 8, se resumen las modificaciones de la histona 3 y se muestran las principales enzimas que pueden escribir o borrar la marca.

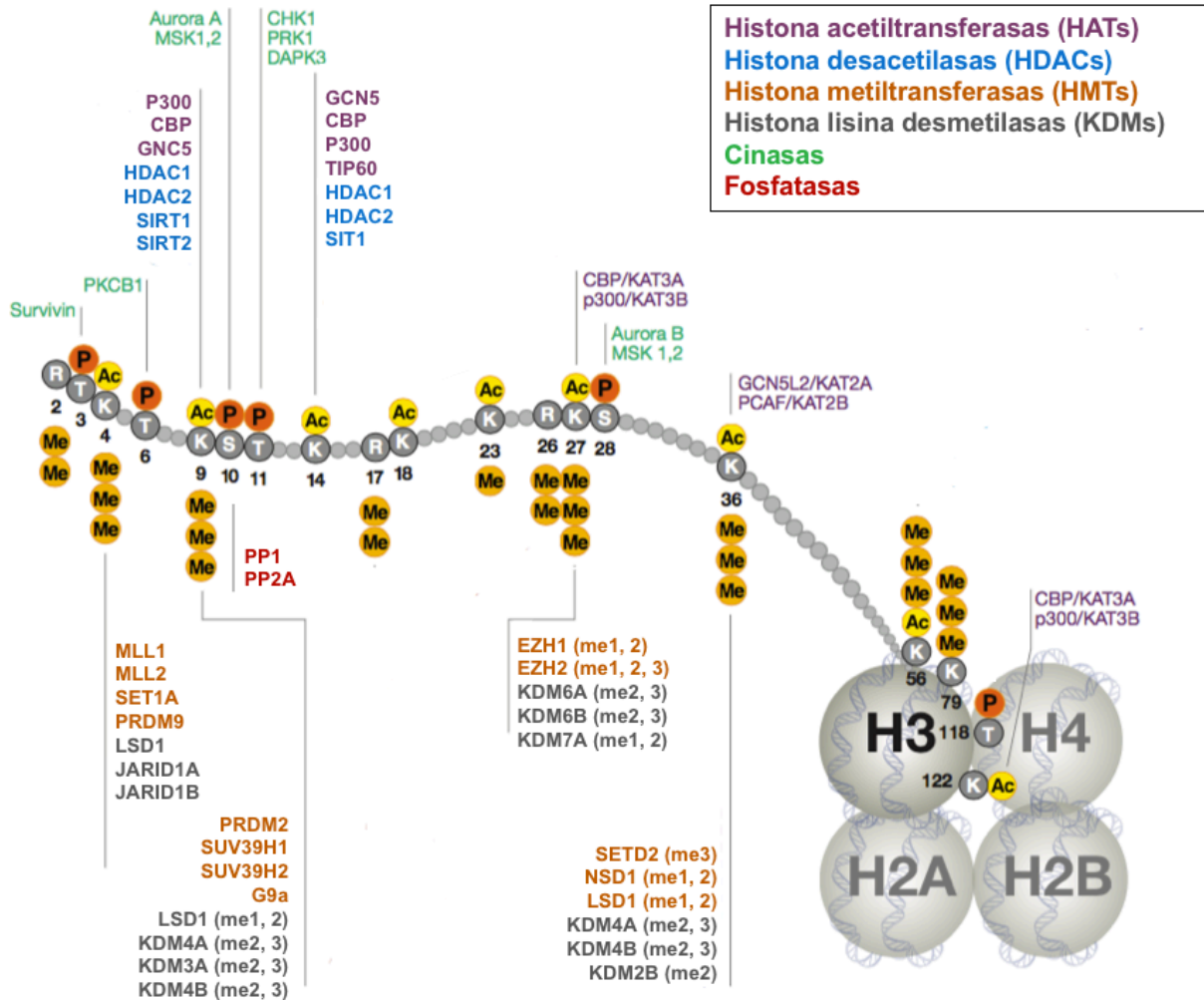


Figura 8. Modificaciones covalentes de la histona 3 y sus enzimas modificadoras. Se muestran las modificaciones epigenéticas de la H3 y se señalan las principales enzimas escritoras y borradoras de la marca. Las letras en parentésis de las HMTs indican el grado de metilación que ponen mientras que las de las KDMs indican el grado de metilación sobre el que actúan. H3: Histona 3, HMT: Histona metiltransferasas, KDM: Histona lisina desmetilasas. Adaptado de Cell signaling Technology ®.

2.3.2 Modificaciones de la histona 3 asociadas a cáncer de mama

En conjunto con la estructura primaria de la cromatina, los datos sugieren que las modificaciones de histonas señalan los elementos genómicos funcionales que regulan la expresión de genes, patrones de “splicing” y modos de represión, los cuales pueden brindar nuevas pistas para la comprensión del funcionamiento celular y predecir la regulación de marcas de histonas en células cancerosas y normales (Zhou et al., 2011). En la Tabla 4 se enlistan los cambios principales que se han visto alterados en las modificaciones de la histona 3 en el cáncer de mama.

Tabla 4. Principales cambios relacionados con las modificaciones de la histona 3 reportados en cáncer de mama.

MODIFICACIÓN	ALTERACIONES EN CÁNCER DE MAMA	REFERENCIA
Acetilación	Disminución de H3K9ac, H3K18ac Sobreexpresión de HDAC1, 3 y 6	Ceccacci y Minucci, 2016; Luo et al., 2011
Metilación	Aumento de H3K9me3 y H3K27me3 Sobreexpresión de LSD1 y KDM1A	LeRoy et al., 2013; Perillo et al., 2008
Fosforilación	Aumento de H3S10fos	Jovanovic et al., 2010

2.3.3 Compuestos naturales como moduladores epigenéticos

Como resultado del estudio de las modificaciones epigenéticas implicadas en el desarrollo y la progresión del cáncer, se ha propuesto el uso de moduladores epigenéticos con diferentes blancos terapéuticos como una forma de prevención y/o tratamiento (Schnekenburger et al., 2014). Se han reportado diferentes compuestos naturales aislados de animales, plantas, hongos, entre otros, capaces de afectar los mecanismos moleculares epigenéticos que modulan la expresión de

genes así como la respuesta de daño al ADN, lo cual puede disparar diferentes vías de muerte celular (Ratovitski, 2015).

En el cáncer de mama, los tratamientos con inhibidores de HAT y HDAC representan una opción potencial en el tratamiento y la quimioprevención. Por ej., la epigalato catequina (EGCC) encontrada en el té verde, mostró una reducción significativa de la acetilación de H3K9 en ambos modelos de MCF-7 y MDA-MB-231 (Khan et al., 2012; Yu et al., 2014), mientras que el sulforafano, un isocianato encontrado en las crucíferas, mostró efecto inhibitor de HDAC y el consecuente incremento de acetilación de histonas en ambas líneas de cáncer mamario (Jackson y Singletary, 2004). En la tabla 5, se enlistan algunos compuestos naturales que han sido estudiados como moduladores epigenéticos prometedores para el tratamiento de cáncer.

Tabla 5. Ejemplos de compuestos naturales que han mostrado actividad como moduladores epigenéticos.

COMPUESTO	ORGANISMO	TIPO	MECANISMO	REFERENCIA
NaB	Fermentación intestinal de fibra dietética	Ácido graso de cadena corta	HDACi, incremento de acetilación de histonas	Saldanha et al., 2014
EGCC	<i>Camellia sinensis</i> (Té verde)	Catequinas	P300i, disminución de acetilación de histonas	Saldanha et al., 2014
Curcumina	<i>Curcuma longa</i> (Cúrcuma)	Ácido fenólico	HATi, disminución de H3K27me3	Reuter et al., 2011
DIM	Varias crucíferas	Indol	HDACi, disminución en la expresión de HDAC1-3, 8	Beaver et al., 2012
VPA	<i>Valeriana officinalis</i> (Valeriana)	Ácido graso de cadena corta	HDACi, disminución en la expresión de HDAC2	Lee et al., 2015
Lunasina	<i>Solanum</i>	Péptido	HATi,	Jin et al., 2007

	<i>nigrum</i> (Tomatillo del diablo) <i>Glycine max</i> (Soya)		disminución en la acetilación de H3 y H4	Gálvez et al., 2001
NaB= Butirato de sodio; EGCC= Epigalato catequina; DIM= 3,3'-diindolilmetano; VPA= Ácido valproico. La letra i minúscula indica inhibidor.				

A diferencia de los demás compuestos, de los cuales la mayoría se consideran como metabolitos secundarios vegetales, la lunasina es un péptido bioactivo de la soya que ha mostrado tener efectos en las vías de regulación epigenética en células de mamíferos. La lunasina purificada de semillas del tomatillo del diablo (*Solanum nigrum*) mostró actividad sobre células NIH 3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón (Jin et al., 2007), mientras que la lunasina purificada de la semilla de soya (*Glycine max*) presentó efecto modulador y anticanceroso en la línea celular de fibroblastos de ratón C3H y en células MCF-7 de cáncer de mama (Gálvez et al., 2001).

2.4 Péptidos antimicrobianos como estrategia para el tratamiento del cáncer

De forma convencional, los tratamientos para el cáncer involucran procedimientos como cirugía, quimio o radioterapia y más recientemente terapias hormonales e inmunoterapia (Cassileth y Deng, 2004). A pesar de que el blanco de los agentes utilizados para dichas terapias son las células dañadas, también pueden causar alteraciones en células normales o en su defecto pueden fallar en eliminar células cancerosas quiescentes, lo que comúnmente desencadena en la recurrencia de la enfermedad aún después de un tratamiento inicial exitoso (Valdespino-Gómez y Valdespino-Castillo, 2012). Es por ello que se han dirigido esfuerzos en la búsqueda de nuevos fármacos a través del desarrollo de pequeñas moléculas que puedan ser fácilmente dirigibles, por lo que resulta atractiva una nueva clase de agentes anticancerosos basados en péptidos (Boohaker et al., 2012).

Los péptidos son moléculas formadas por combinaciones de aminoácidos ligados entre sí por enlaces peptídicos a través de una reacción de deshidratación o condensación; pueden ser obtenidos como productos de proteólisis, síntesis *in vivo*, o bien por síntesis artificial. En años recientes, se ha demostrado que los péptidos juegan un papel importante en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, ya que pueden participar como marcadores para un diagnóstico temprano o como parte del tratamiento (Xiao et al., 2015).

Entre los péptidos más prometedores para ser utilizados en terapias para el tratamiento del cáncer se encuentran los péptidos antimicrobianos o AMPs (en humanos también llamados péptidos de defensa del hospedero o Host defense peptides), los cuales forman parte de la primera línea de defensa en numerosos organismos como mamíferos, anfibios, insectos y plantas (Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

La mayoría de los AMPs son relativamente cortos, de entre 10-50 aminoácidos, mostrando generalmente una carga positiva que va de +2 a +11 y conteniendo cerca del 50% de residuos hidrofóbicos. De acuerdo a su estructura secundaria, los AMPs se clasifican en 3 grupos: los α -helicoidales, los lámina β y los péptidos de bucles aleatorios, siendo los primeros 2 grupos los más comunes (Mahlapuu et al., 2016). Dentro de los α -helicoidales, se calcula que la distancia entre 2 aminoácidos adyacentes es cercana a 0.15 nm y el ángulo entre ellos, desde un punto central es de 100° con una vista desde arriba; algunos ejemplos de este grupo son la protegrina, magainina, indolicina cíclica, el LL-37 (precursor inactivo de la catelicidina humana) y la lactoferricina, la cual deriva de la lactoferrina presente en la leche (Bahar y Ren, 2013). Los péptidos compuestos por láminas β tienen al menos 2 cadenas β unidas entre sí por puentes disulfuro que se organizan para crear una molécula anfipática. El grupo más estudiado de este grupo son las defensinas (Zhao et al., 2015).

En la base de datos de los AMPs (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), se han caracterizado más de 2800 péptidos, los cuales presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, insecticida, antioxidante, anticancerosa, entre otras. Dentro de la actividad citotóxica se han reportado más de 200 AMPs

tóxicos para diferentes células de mamífero y para algunos se ha determinado que pueden inducir necrosis o apoptosis (Boohaker et al., 2012). En este sentido, se ha encontrado que la cecropina, un AMP de la mosca (*Musca domestica*) inhibió la proliferación de la línea celular BE L-7402 de hepatocarcinoma humano, a través del incremento en la expresión de genes relacionados con apoptosis, como *Fas*, *Fas L*, *Caspasa 8* y *Caspasa 3* (Jin et al., 2010). En contraste, la dermaseptina B2, un AMP con actividad antibacteriana membranolítica aislado de la piel de la rana suramericana, demostró tener un efecto anticanceroso en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de próstata (PC3), siendo evaluada esta última línea celular en un modelo xenográfico. Este péptido, no indujo la activación de caspasas ni cambios en el potencial de membrana mitocondrial, pero si mostró interacción con la membrana plasmática y su posterior lisis, por lo que se sugiere un mecanismo de necrosis (Van Zoggel et al., 2012). Por otro lado, también se han reportado péptidos que involucran ambos mecanismos de acción, siendo el caso de la lactoferricina bovina B6 (Richardson et al., 2009) y la gomesina, aislada de la tarántula brasileña (Rodrigues et al., 2008) (Tabla 6).

Adicionalmente, los efectos antitumorales de los AMPs también podrían derivar de la activación de mecanismos de respuesta inmune (Boohaker et al., 2012).

Tabla 6. Ejemplos de péptidos antimicrobianos que han mostrado efecto citotóxico contra líneas celulares de diferentes tipos de cáncer a través de modos de acción diversos.

PÉPTIDO	ORGANISMO	TIPO DE CÁNCER	MODO DE MUERTE	REFERENCIA
Dermaseptina B2	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Mama y próstata	Necrosis	Van Zoggel et al., 2012
Lactoferricina bovina B6	<i>Bos taurus</i>	Leucemia, mama	Apoptosis y necrosis	Richardson et al., 2009
Gomesina	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Cervicouterino, colon y mama	Apoptosis y necrosis	Rodrigues et al., 2008

2.4.1 Defensinas de plantas

Dentro de las plantas se han reportado más de 300 AMPs, los cuales son expresados constitutivamente o en respuesta a un ataque de patógenos. Existen 12 familias de AMPs de plantas, de las cuales tres contienen integrantes que muestran propiedades anticancerosas: los ciclótidos, las tioninas y las defensinas (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). Estas últimas constituyen el grupo más estudiado y más abundante de los AMPs vegetales; son péptidos catiónicos de 45 a 54 aa, caracterizados generalmente por 4 puentes disulfuro conservados entre sus cisteínas (Tam et al., 2015), los cuales son importantes para su plegamiento en su estructura tridimensional pero también para su actividad antimicrobiana y quimiotáctica (Zhao et al., 2015).

Una de las características más interesantes de las defensinas de plantas es su capacidad selectiva hacia células cancerosas, para la cual existen evidencias de que dicho fenómeno se asocia a los componentes diferenciales entre las membranas de las células cancerosas respecto a las normales (Gaspar et al., 2013). Adicionalmente, en años recientes se ha demostrado que las características fisicoquímicas y estructurales de las defensinas son clave para conferirles sus propiedades citotóxicas selectivas (Zhao et al., 2015).

2.4.2 Mecanismo de acción de las defensinas vegetales citotóxicas

A pesar de la información sobre los mecanismos de muerte que pueden estar activando las defensinas en las células cancerosas, existe un gran desconocimiento de las rutas de activación que conducen a estos mecanismos (Tam et al., 2015). Una de las defensinas más estudiadas es NaD1, la cual se aisló de las flores de *Nicotiana glauca*, y cuya región madura ha mostrado actividad contra fitopatógenos del género *Fusarium* sp., y contra *Botrytis cinerea*. Esto a través de la interacción con componentes específicos de la pared, seguido de la lisis de la membrana plasmática y la salida de los componentes celulares (De Coninck et al., 2013). Asimismo, ha mostrado efecto contra hongos filamentosos

de mamíferos como *Candida albicans*, en el cual el mecanismo de acción no sólo comprendió la lisis celular, sino que indujo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de vías de estrés osmótico (Hayes et al., 2013). De forma similar, se vio la inducción de necrosis en células de melanoma (MM170) y leucemia (Jurkat T), y se observó una interacción con la membrana mitocondrial a través de los residuos de cardiolipina (Baxter et al., 2017). En este sentido, la defensina TPP3 de tomate (*Solanum lycopersicum*) comparte 63 % de identidad en su secuencia con NaD1, y ha mostrado la capacidad de unirse a lípidos de la membrana como PIP2, cuya unión facilita la oligomerización e induce la permeabilización de la membrana de células de hongos como *C. albicans* y de mamíferos como las U937 de linfoma monocítico (Baxter et al., 2015).

Por otro lado, las defensinas PaDef de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) y γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) inducen la apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7, lo cual involucra cambios en el potencial de membrana mitocondrial (Guzmán-Rodríguez, 2016), además de que incrementan significativamente la producción de ROS (Guzmán-Rodríguez, datos no publicados) (Tabla 7).

Tabla 7. Ejemplos de defensinas de origen vegetal que han mostrado citotoxicidad en células de cáncer.

PÉPTIDO	ESPECIE	LÍNEA CELULAR	SELECTIVIDAD	MODO DE MUERTE	REFERENCIA
NaD1	<i>Nicotiana alata</i>	MM170, Jurkat T	Sí	Necrosis	Baxter et al., 2017
TPP3	<i>Solanum lycopersicum</i>	U937	No probada	Necrosis	Baxter et al., 2015
PaDef	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	HeLa, MCF-7	Sí	Apoptosis intrínseca	Guzmán-Rodríguez et al., 2016

γ -tionina	<i>Capsicum chinense</i>	HeLa, MCF-7	Sí	Apoptosis intrínseca y extrínseca	Anaya et al., 2006; Guzmán-Rodríguez, 2016
-------------------	--------------------------	-------------	----	-----------------------------------	--

2.4.3 Características del AMP γ -tionina de chile habanero

El AMP γ -tionina es una defensina que se identificó a partir del transcriptoma del chile habanero (*C. chinense*), en el cual se ha propuesto que actúa como agente antifúngico (Gaspar et al., 2013). En la planta se han detectado sus transcritos principalmente en raíces, tallo, flores, semillas y placenta, encontrándose en menor cantidad en hojas y en niveles indetectables en las paredes del fruto (De Coninck et al., 2013). Aunque el péptido no se ha purificado directamente de la planta, su secuencia se obtuvo a partir de una biblioteca de ADNc de tejido placentario de frutos inmaduros de chile habanero por lo que su actividad no ha sido aún descrita *in vivo* (Anaya-López et al., 2006).

De acuerdo a diferentes análisis bioinformáticos, la defensina γ -tionina está constituida por 107 aa y tiene un peso molecular de 9 kDa, conformándose por 3 regiones: la primera región corresponde a un péptido señal en el extremo N-terminal y comprende los aminoácidos 1 al 25; la segunda región es la parte madura del péptido, se compone de los aminoácidos 25 a 75 y es la que muestra la actividad antimicrobiana; la tercera región es una región ácida constituida por los aminoácidos del 76 al 107 (Anaya-López, 2006). El AMP γ -tionina presenta porcentajes de identidad mayores al 50% con otras defensinas vegetales cuya función ha sido bien caracterizada, por ej., presenta un 57% de identidad con NaD1 en su región madura (Lay, 2003).

La región madura del AMP γ -tionina se compone de 50 aa y tiene un peso molecular de 5.7 kDa, presentando 8 residuos de cisteína que le permiten formar 4 puentes disulfuro (Figura 9). Asimismo, el análisis *in silico* previamente realizado en el grupo de trabajo, muestra que la molécula posee una carga neta +5.99 y un índice de hidrofobicidad Kyte-Doolittle de 0.14, exhibiendo una distribución de los

residuos con carga positiva ubicados en la hélice α , orientados hacia el exterior de la molécula, con lo cual se puede favorecer su interacción con los residuos negativos de la membrana plasmática, facilitando la formación de poros transitorios para que el péptido se internalice y posteriormente pueda desencadenar la respuesta apoptótica (Guzmán-Rodríguez, 2016).

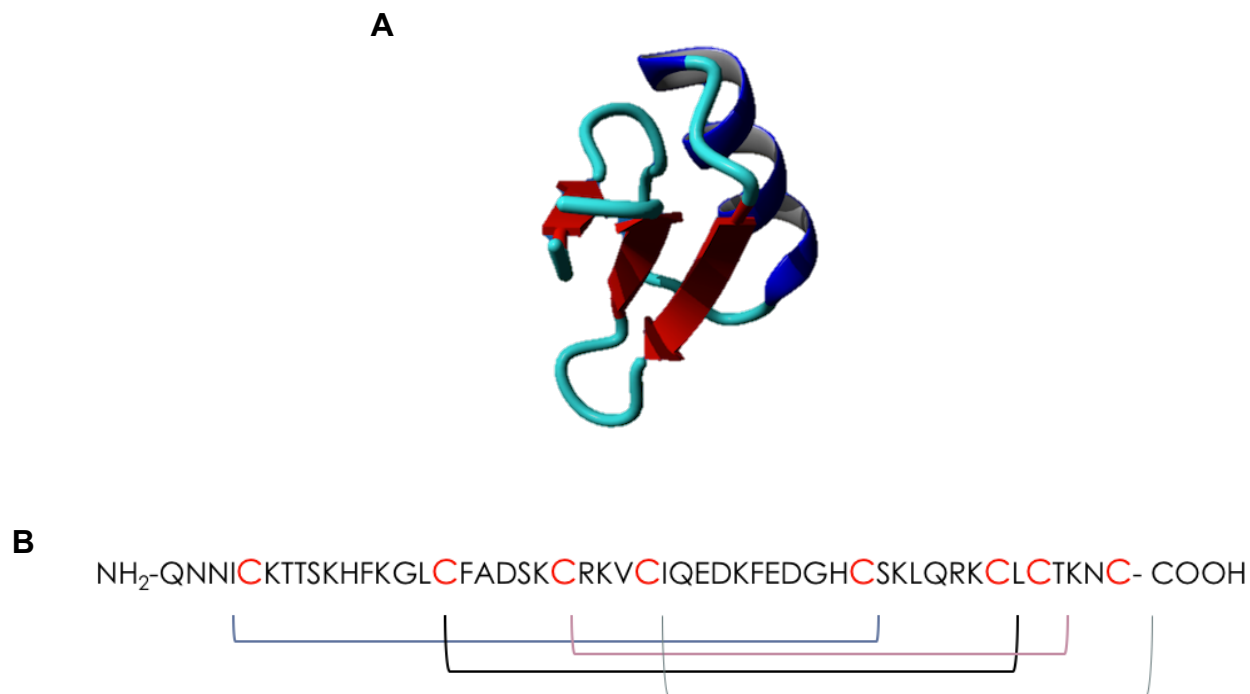


Figura 9. La defensina γ -tionina de chile habanero. A. Estructura tridimensional putativa del AMP γ -tionina. **B.** Secuencia de aminoácidos de la región madura de γ -tionina. Las letras “C” agrandadas y en rojo representan las cisteínas que forman los puentes disulfuro. Tomado de Guzmán-Rodríguez et al., 2016.

En el grupo de trabajo han evaluado la función antimicrobiana de la región madura de γ -tionina. Esta defensina se expresó a través de un sistema heterólogo en células de endotelio bovino (CEB), y al evaluar el medio condicionado se observó que ejercía actividad antimicrobiana contra patógenos de mamíferos como *C. albicans* (Anaya-López et al., 2006), y bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente (Loeza et al., 2010). De igual forma, se demostró que γ -tionina (sintetizada

químicamente) posee un efecto inmunomodulador en células de epitelio mamario bovino (CEMB), ya que favoreció la expresión del gen del receptor TLR2 y la producción de citocinas pro inflamatorias como TNF- α e IL-1 β , y anti inflamatorias como IL-10 (Díaz-Murillo et al., 2016).

2.4.4 Antecedentes directos

La mayoría de las defensinas de plantas muestran actividad antibacteriana y antifúngica contra un amplio espectro de fitopatógenos. No obstante, también se ha reportado actividad citotóxica de defensinas vegetales contra líneas de células cancerosas humanas (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). En este sentido, en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, el medio condicionado de CEB que expresan el AMP γ -tionina afectó significativamente la viabilidad (100%) de células HeLa de cáncer cervicouterino (Anaya-López et al., 2006). En el mismo sentido, el péptido sintetizado químicamente ha mostrado citotoxicidad en células Caco-2 de cáncer de colón (Velázquez-Hernández, 2017), leucemias (Jurkat) (Flores-Álvarez, datos no publicados) y en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (IC₅₀ de 117.19 μ g/ml) (Guzmán-Rodríguez, 2016). En contraste, la viabilidad de células no cancerosas como las CEMB y Células Mononucleares de Sangre Periférica Humanas (PBMC), no se afectó al someterse a las mismas concentraciones del péptido, lo que indica su selectividad hacia células cancerosas (Guzmán-Rodríguez, 2016) (Figura 10).

En el caso particular de la línea MCF-7, el AMP γ -tionina es citotóxico a través de la inducción de mecanismos apoptóticos mediante la vía intrínseca en tiempos cortos de exposición (6 h), ya que indujo la expresión de genes de *citocromo c*, *Apaf-1*, *caspasa 9* y la caspasa efectora *caspasa 7*; pero a tiempos largos (24 h) se activó la expresión de genes involucrados en la vía extrínseca (*Fas*, *Fas L* y *caspasa 8*) (Figura 11).

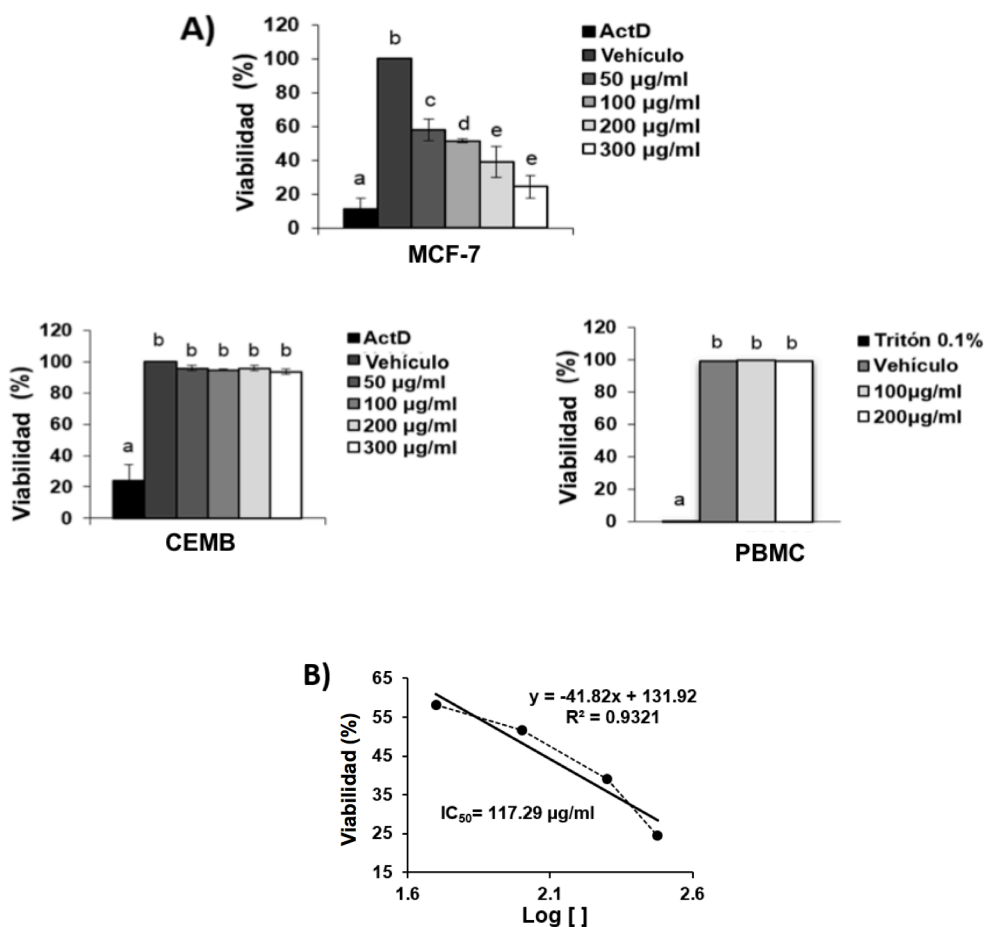


Figura 10. Citotoxicidad de la defensina γ -tionina en células MCF-7, CEMB y PBMC. A) Ensayos de viabilidad mediante exclusión de azul tripano tras 48 h de exposición a la defensina γ -tionina. **B)** Regresión lineal de la concentración-respuesta para calcular la media de la concentración máxima inhibitoria de γ -tionina sobre las células MCF-7 ($IC_{50} = 117.29 \mu\text{g/ml}$). CEMB: Células de epitelio mamario bovino, PBMC: Células mononucleares de sangre periférica. Tomado de Guzmán-Rodríguez, 2016.

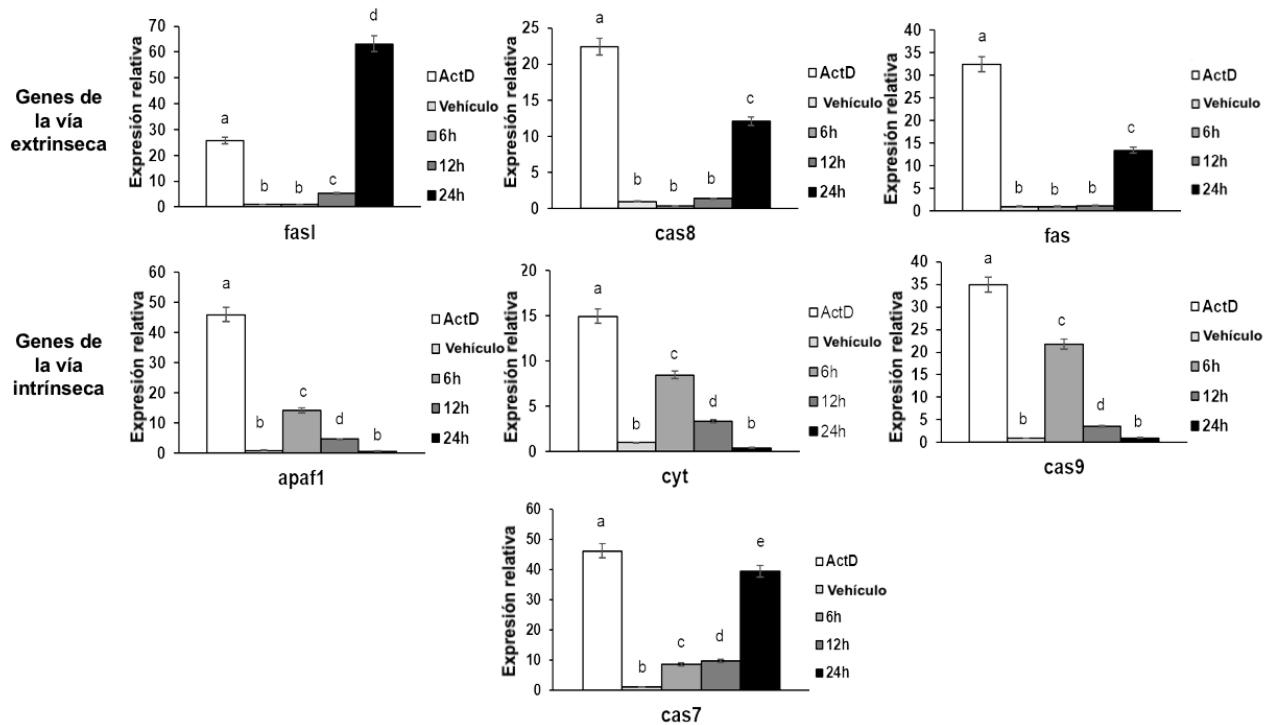


Figura 11. Regulación de la expresión de genes vinculados con apoptosis en células MCF-7 por la defensina γ -tionina. Ensayos realizados por RT-qPCR. Las células fueron tratadas con el AMP durante 6, 12 y 24 h y luego se extrajo el ARN total para la síntesis del ADNc. Letras diferentes indican diferencia significativa respecto al vehículo. Cas8: Caspasa 8, Cyt: Citocromo C, Cas9: Caspasa 9, Cas7: Caspasa 7, ActD: Actinomicina D 10 μ M. Tomado de Guzmán-Rodríguez, 2016.

III. JUSTIFICACIÓN

Diferentes estudios han evidenciado que alteraciones epigenéticas que involucran modificaciones de las histonas, principalmente en la histona H3, contribuyen de forma sustancial en el inicio y progresión de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de mama. Dentro de estas modificaciones, la acetilación y metilación de la H3K9 así como la fosforilación de H3S10, se han vinculado a procesos de apoptosis debido a su participación en la regulación transcripcional.

Por lo anterior, es importante identificar los eventos epigenéticos globales o específicos que correspondan a cambios iniciales o secundarios en líneas celulares cancerosas tras su exposición a moléculas terapéuticas alternativas, lo que permitirá comprender de una manera más amplia los mecanismos de acción y, por ende, se pueda diseñar una terapia dirigida y específica.

Resultados recientes de nuestro grupo de trabajo demuestran que el AMP γ -tionina obtenido de chile habanero posee actividad citotóxica sobre células de cáncer de mama MCF-7, además de que modifica la expresión de algunos genes asociados al ciclo celular y a la apoptosis. No obstante, se desconocen las vías epigenéticas relacionadas a dichos efectos. Actualmente no existen reportes sobre la regulación epigenética inducida por los AMPs.

IV. HIPÓTESIS

La actividad citotóxica del AMP γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama está relacionada con un incremento global de H3K9ac y con una disminución global de H3K9me2/3 y H3S10fos.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar a nivel global las modificaciones epigenéticas H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos, asociadas a la actividad apoptótica del péptido antimicrobiano γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

5.2 Específicos

- Determinar el nivel global de las modificaciones H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos, en las células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina.
- Analizar la expresión de enzimas modificadoras que participan en la regulación de las modificaciones epigenéticas H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos, en células MCF-7 tratadas con el AMP γ -tionina.
- Establecer la relación entre las modificaciones de la histona H3 H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos y la apoptosis inducida por el AMP γ -tionina en la línea celular MCF-7.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

Para el presente estudio se utilizó la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma mamario (ATCC HTB-22). Esta línea celular mantiene parcialmente las características del epitelio mamario diferenciado, debido a su capacidad de respuesta a estrógenos. Las células se mantuvieron en medio DMEM F12-Ham (Sigma) adicionado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomicina, incubadas en una cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

6.2 El AMP γ -tionina de chile habanero

El péptido γ -tionina utilizado en este estudio corresponde a la región madura (50 aa QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC) (Aluru et al., 1998). Este péptido se sintetizó químicamente (BIOMATIK) y se preparó una solución stock (5 mg/ml) en dimetilsulfóxido (DMSO) al 20%, la cual se dejó oxidar en agitación durante 5 días a temperatura ambiente para lograr la formación de los puentes disulfuro. Adicionalmente, la actividad biológica del AMP γ -tionina se confirmó mediante la evaluación de su efecto antifúngico contra *C. albicans* (ATCC 10231) como se describió previamente (Anaya-López et al., 2006). Para todos los experimentos, la concentración final del vehículo DMSO fue menor al 0.5%.

6.3 Ensayo de viabilidad y modo de muerte celular

Previo a la evaluación epigenética, se realizó un ensayo de citotoxicidad para corroborar el efecto apoptótico del AMP γ -tionina en la línea MCF-7. Para este fin, se sembraron 15,000 células por pozo en placa de 96 pozos (Corning), las cuales se trataron por 24 h con la IC₅₀ del péptido (117.29 μ g/ml) (Guzmán-Rodríguez, 2016). Transcurrido el tiempo, las células se despegaron y se mezclaron en partes iguales con el colorante azul tripano, posteriormente se cuantificaron las células vivas y muertas con un contador automático (Bio-Rad). Los datos obtenidos se expresaron como número de células vivas y muertas.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de apoptosis/necrosis para corroborar el modo de muerte celular inducido por el AMP γ -tionina en células MCF-7, esto se evaluó mediante citometría de flujo y utilizando anexina V. Para este ensayo se sembraron nuevamente 15,000 células/pozo en placa de 96 pozos, las cuales se trataron con el AMP γ -tionina como se describe previamente, se despegaron y se centrifugaron para obtener la pastilla celular. A continuación, se tiñeron con anexina V para detectar apoptosis y 7AAD para detectar necrosis. La externalización de fosfatidilserina en la superficie de la membrana plasmática fue analizada usando un citómetro de flujo BD Accuri™ C6. Se colectaron 10,000 eventos y se utilizó actinomicina D como control positivo de apoptosis. Los datos se analizaron mediante el software BD accuri™ Software Analysis.

6.4 Extracción de histonas de células MCF-7 tratadas con el AMP γ -tionina

Las células (1×10^6 células/caja de 5 ml) se crecieron al 80% de confluencia y se incubaron en medio incompleto por 16 h, luego fueron tratadas con la IC_{50} del AMP γ -tionina (117.29 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron en cámara húmeda a 37°C con 5% de CO_2 durante 0, 6, 12 y 24 h.

La extracción de histonas se llevó a cabo mediante el protocolo de extracción ácida. Para ello, las células se lavaron con PBS incompleto frío (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 y 10 mM KH_2PO_4); se resuspendieron en 1.5 ml de solución H-lisis (0.25 M sacarosa, 3 mM CaCl_2 , 1 mM Tris pH 8 y 0.5% NP-40); se rasparon con una pala de plástico estéril y se centrifugaron a 3,900 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, la pastilla celular se lavó con 1 ml de solución H-lavado (300 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT y 0.5% NP-40). La extracción de histonas se realizó con la adición de 200 μl de solución H-extracción (0.5 M HCl, 10% glicerol y 0.1 M 2-mercaptoetilamina-HCl), incubándose en hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se añadió acetona fría relación 1:5. El precipitado de histonas se recuperó por centrifugación, el cual se disolvió en 100 μl de agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.5 Análisis de Western blot

Para evaluar las modificaciones de las histonas se realizó un análisis global mediante Western blot. Las muestras de histonas se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 15%, y posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de PVDF a través de una unidad de transferencia semiseca (Fisher Scientific). Para ello, se equilibró el gel durante 15 min en la solución de transferencia III (0.3 M Tris pH 10.4) y la membrana (previamente hidratada en metanol) en la solución II (0.25 M Tris pH10.4). Se armó el sandwich de transferencia y se dejó correr a 15 V durante 1 h. A continuación, la membrana se bloqueó con leche descremada en polvo al 5% disuelta en PBS frío y se dejó a 4°C toda la noche. La membrana se lavó tres veces con PBS frío, y luego se adicionó el anticuerpo primario (1:1,000) y se incubó a 4°C toda la noche. Se emplearon los siguientes anticuerpos contra modificaciones específicas: H3K9ac (Abcam, ab10812) para acetilación; H3K9me2 (Abcam Ab1220) y H3K9me3 (Abcam, ab8898) para metilación; y H3S10fos (Abcam, ab5176) en el caso de fosforilación. Como control de carga se utilizó el anticuerpo para la histona H3 (Abcam, ab1791). Posteriormente, la membrana se incubó durante 2 h a 4°C con el anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a la peroxidasa de rábano (1:3,000) (Cell Signalling Technology). La membrana se lavó tres veces y se agregaron 100 μ l de sustrato WesternSure™ ECL. Finalmente, la membrana se colocó entre dos hojas plásticas y se expuso a una placa de rayos X. La placa fue revelada manualmente en oscuridad. La intensidad de las señales fue cuantificada por densitometría con el software ImageStudio Lite versión 5.2.5 de Li-Cor Biosciences. Se utilizó butirato de sodio 30 mM como control positivo de la inducción de acetilación de H3K9 y estradiol 1 nM como control positivo para la inducción de H3K9me2/3. Los datos se normalizaron respecto a H3 y se presentaron como el nivel relativo de expresión respecto al vehículo.

6.6 Ensayos de expresión génica

Las células MCF-7 se crecieron en placa de 24 pozos (60,000 células/pozo) y se expusieron a la IC₅₀ de γ -tionina (117.29 μ g/ml) durante 6, 12 y 24 h.

Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se extrajo el ARN total mediante el uso del reactivo Trizol™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La muestra obtenida se trató con DNAsa I (Invitrogen) para remover el ADN contaminante. El ARN total se usó para sintetizar ADNc a través de la reacción de transcripción inversa de acuerdo a lo establecido previamente (Alva-Murillo et al., 2012). La reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l conteniendo 25 μ g/ml de Oligo d(T)15-18 (Invitrogen) y 500 nm de mezcla de dNTPs (Invitrogen). La reacción se incubó a 65° C por 5 minutos e inmediatamente se transfirió a hielo. Se añadieron 4 μ l de First Strand Buffer (Invitrogen) y se incubó a 37° C durante 2 min. Finalmente se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/ μ l, Invitrogen) y se incubó a 37° C durante 50 min, seguido de 15 min a 70° C para inactivar la reacción.

Para los ensayos de expresión se diseñaron juegos de oligonucleótidos mediante el paquete bioinformático DNASTar (Tabla 6). El análisis de la expresión de genes se realizó por RT-qPCR (StepOne Plus Real-Time PCR, Applied Biosystems) utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Radiant). Se evaluó la expresión de genes relacionados con las rutas activadoras de apoptosis como *p53*, además de evaluar genes vinculados a cáncer de mama con respuesta a estrógenos, como el receptor de estrógenos α (*Esr1*); asimismo, con base en los resultados obtenidos con las modificaciones globales, se evaluó la expresión del ARNm de las enzimas modificadoras de marcas de histonas como HDACs, KDM4A y Aurora B (AURKB). Adicionalmente se evaluaron genes relacionados al ciclo celular como *p21* y la ciclina D1. Los valores de expresión se normalizaron mediante el método $\Delta\Delta$ Ct respecto a la expresión del gen endógeno β -actina.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en este estudio para realizar los ensayos de expresión génica.

GEN	SECUENCIA 5' A 3'	T _m (°C)	P _b	REFERENCIA
<i>p53</i>	F- TTCTCCACTTCTTGTTCCCCACTG R- ATCCTCCTCCCCACAACAAAACAC	58	194	Guzmán-Rodríguez et al., 2016
<i>Esr1</i>	F- TACGAAGTGGGAATGATGAAAG R- AAGGCAGCTCTCATGTCTCC	58	138	Este estudio
<i>KDM4A</i>	F- CCTGGCCAAGCACCGAATAG R- GGGCACTCCGTCATCTCATACTG	57	127	Este estudio
<i>HDAC1</i>	F- CACCCGGAGGAAAGTCTGTT R- TGGCTTTGTGAGGGCGATAG	61	200	Este estudio
<i>HDAC2</i>	F- GCCCCATAAAGCCACTGCCGAAG R- GCTCCAGCAACTGAACCGCCAG	61	178	Este estudio
<i>AURKB</i>	F- CATCTTAACGCGGCACTTCACAAT R- CTCCACGCCCTCCTTCTCTATCTG	56	160	Este estudio
<i>p21</i>	F- GCAGACCAGCATGACAGATTT R- GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA	55	70	Guzmán-Rodríguez et al., 2016
<i>Ciclina D1</i>	F- TGCCTTTGTGGAAGTGTACGG R- GTTGACTTCACTTGTGGCCCA	60	140	Guzmán-Rodríguez et al., 2016
<i>β-actina</i>	F- AAAACCTAACTTGCGCAGAAAAACA R- TGTCACCTTCACCGTTCCACTTT	57	317	Guzmán-Rodríguez et al., 2016

- Supresores de tumores
- Receptor de estrógenos α
- Enzimas modificadoras de histonas
- Genes relacionados con proliferación celular
- Gen endógeno

6.7 Evaluación de la inhibición de HDACs

Con base en los resultados obtenidos de la evaluación de las modificaciones de las histonas a nivel global y los cambios en la expresión génica

evaluados por RT-qPCR, se evaluó el efecto del AMP γ -tionina sobre la actividad de las HDACs mediante el uso del kit Fluor de Lys® (Enzo). Este estudio evalúa HDACs de clase I (HDAC1, 2, 3 y 8), IIa (HDAC4, 5 y 7 y 9), y IIb (HDAC6 y 10). Para realizar este procedimiento se sembraron 7,000 células/pozo en placas blancas de 96 pozos por duplicado y se sincronizaron durante 16 h con medio incompleto libre de rojo de fenol. Las células fueron tratadas con la IC₅₀ del AMP γ -tionina durante 6, 12 y 24 h. Posteriormente, el medio se reemplazó con 50 μ l de sustrato Fluor de Lys® y se incubó por 4 h. Las células se lavaron con PBS y se les adicionaron 25 μ l de revelador. Se incubaron por 5 min a 37°C y pasado ese lapso se les agregaron 25 μ l de buffer de ensayo con 1% de NP-40 y 1 μ M de tricostatina A. Se incubaron 10 minutos más y se leyó la fluorescencia a 360 y 460 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición, para lo cual se empleó la siguiente fórmula: $[1-(F_{\text{tratamiento}}-F_{\text{fondo}})/(F_{\text{max}}-F_{\text{fondo}})] \times 100$, donde $F_{\text{tratamiento}}$ correspondió a la fluorescencia de las células expuestas al AMP γ -tionina, F_{max} a la fluorescencia de las células sin tratamiento y F_{fondo} a la fluorescencia del medio sin células (Sunkara et al., 2012). Se utilizó tricostatina A 1 μ M y butirato de sodio 30 mM como control positivo de inhibición.

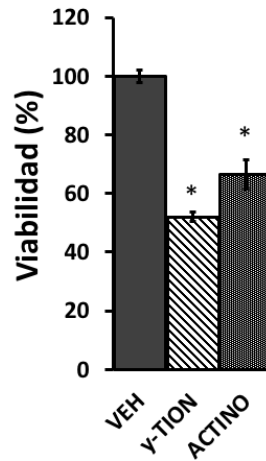
6.8 Análisis estadístico

Los datos mostrados en este trabajo corresponden al menos a 3 experimentos realizados por triplicado. La significancia estadística se estableció con el paquete JMP 3.0 de SAS. La cuantificación relativa de la expresión génica obtenida a través de RT-qPCR se evaluó con el método $\Delta\Delta$ Ct de acuerdo a lo establecido por Morey et al (2006), considerando para ello que valores de cambio mayores a 2 o menores de 0.5 son diferencialmente significativos en la cantidad de ARNm.

VII. RESULTADOS

Previo a los ensayos planteados, se corroboró el efecto apoptótico del AMP γ -tionina ($IC_{50} = 117.29 \mu\text{g/ml}$) en las células MCF-7. Para ello se realizó un conteo de células vivas y muertas mediante un ensayo de azul tripano, así como la evaluación de apoptosis/necrosis por citometría de flujo en tratamientos de 24 h. Como se observa en la figura 12, la defensina γ -tionina disminuyó significativamente la viabilidad celular respecto al vehículo (0.5 veces aprox.); asimismo se incrementó de forma considerable el porcentaje de células en apoptosis temprana respecto al vehículo (aprox. 3 veces).

A)



B)

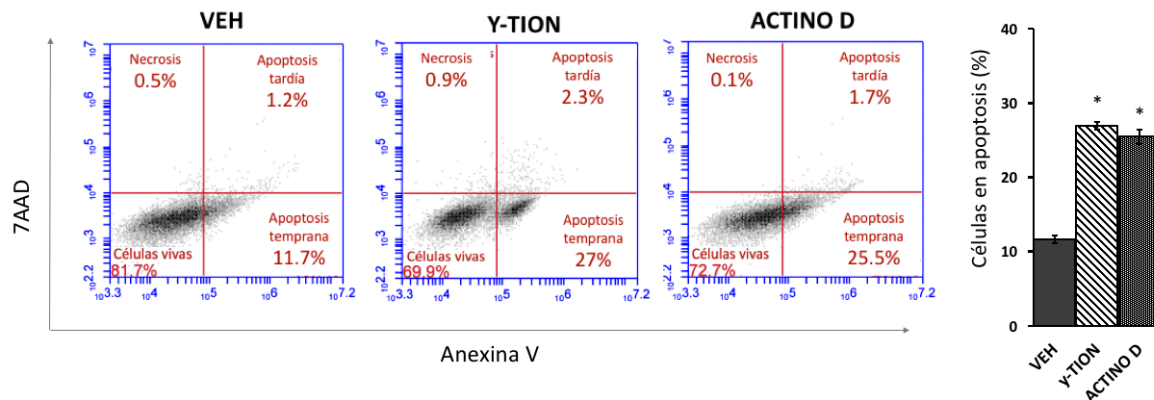


Figura 12. Efecto citotóxico del AMP γ -tionina sobre las células MCF-7. A) Viabilidad de células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina durante 24 h. El 100 % de viabilidad corresponde al tratamiento con mayor porcentaje de células vivas. Datos obtenidos por ensayos de exclusión de azul tripano. **B)** Porcentaje de células MCF-7 en fase de apoptosis temprana. Tratamientos de 24 h. Se muestran plots representativos. *Indica diferencia estadística significativa respecto al vehículo. *t* de student $P \leq 0.05$. $n=4$. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. **VEH**= DMSO 0.5%, **y-TION**= γ -tionina IC₅₀ (117.29 μ g/ml), **ACTINO D**= Actinomicina D 10 μ M.

7.1 Evaluación de la modificación H3K9ac en células MCF-7 por el AMP γ -tionina

7.1.1 El AMP γ -tionina aumenta los niveles globales de acetilación de la H3K9 en las células MCF-7

La acetilación de las histonas, especialmente en la histona H3, es un proceso crítico en la activación de la expresión génica, ya que neutraliza la unión entre la histona y el ADN, facilitando el acceso de la maquinaria de transcripción, entre las modificaciones más relevantes que se han identificado en el cáncer de mama, se encuentra la acetilación de H3K9. Para evaluar esta modificación, las células MCF-7 se expusieron a la IC₅₀ de γ -tionina durante 0, 6, 12 y 24 h. Posteriormente, se obtuvieron las histonas mediante extracción ácida y se separaron en un gel SDS-PAGE, el cual fue transferido a una membrana de PVDF para realizar un western blot.

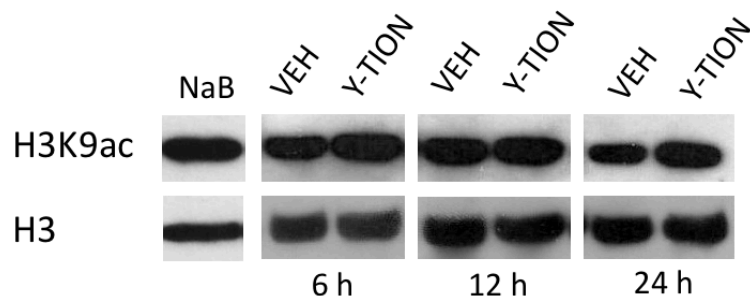
Los resultados mostraron que cuando las células MCF-7 se expusieron a la IC₅₀ de γ -tionina durante 24 h se presentó un incremento notable en el nivel de acetilación en H3K9 (27%) respecto al vehículo (DMSO 0.5%); mientras que, para las evaluaciones de 0, 6 y 12 h no hubo diferencia entre los tratamientos. Se utilizó butirato de sodio como control positivo, el cual indujo notablemente la acetilación de H3K9 (Figura 13).

7.1.2 El AMP γ -tionina inhibe la actividad enzimática de las HDACs en células MCF-7

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de Western blot, en los que se observó un incremento en la acetilación de H3K9, se procedió a evaluar si la defensina γ -tionina afectaba la actividad enzimática de las HDACs. Para lo cual se utilizó el kit Fluor de Lys® en células expuestas a los tratamientos durante 6, 12 y 24 h.

Los datos mostraron que la defensina inhibió significativamente la actividad de las HDACs, obteniéndose un pico máximo de inhibición de hasta el 40% a las 6 h, el cual fue disminuyendo con el paso del tiempo, alcanzando un porcentaje de inhibición de 16.18% a las 12 h, mientras que a las 24 h no se detectaron cambios significativos respecto al vehículo (Figura 14).

A)



B)

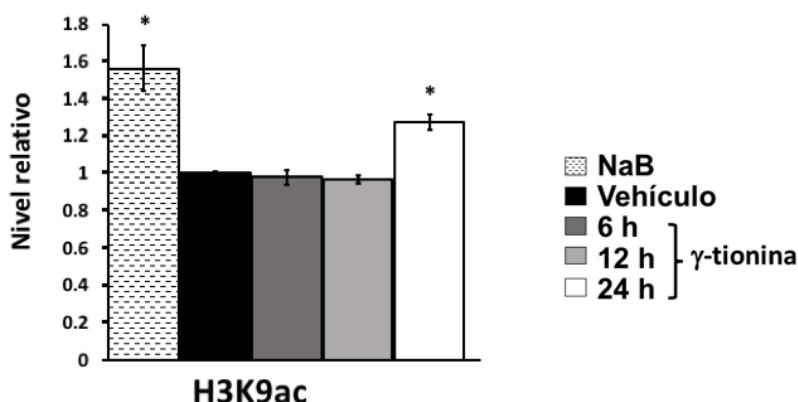


Figura 13. El AMP γ -tionina aumenta los niveles globales de acetilación de la H3K9 en células MCF-7. Se extrajeron las histonas de células tratadas por 6, 12 y 24 h con la IC_{50} (117.29 μ g/ml) de γ -tionina. Posteriormente se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de western blot. **A)** Imagen representativa de Western blot, **B)** Análisis densitométrico. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Se utilizó NaB como control positivo de acetilación de H3K9. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo.

* indican diferencia estadística significativa respecto al vehículo. *t* de student $P \leq 0.05$. $n=4$. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. **NaB**= Butirato de sodio 30 mM, **Vehículo**= DMSO 0.5%.

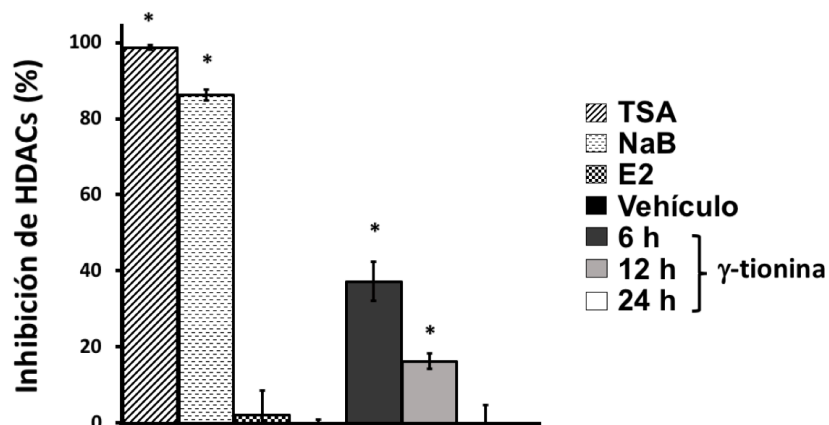


Figura 14. Evaluación de la inhibición de la actividad enzimática de HDACs por el AMP γ -tionina en células MCF-7. Las células se trataron por 6, 12 y 24 h con la IC₅₀ (117.29 μ g/ml) de γ -tionina y posteriormente se evaluó la inhibición de las HDACs mediante el uso del kit Fluor de Lys® (Enzo). Los valores fueron normalizados respecto al vehículo, el cual se consideró como el tratamiento con 0% de inhibición. Se utilizaron TSA y NaB como control positivo de inhibición de HDACs y E2 como control negativo. *Indican diferencia estadística significativa respecto al vehículo. *t* de student $P \leq 0.05$. $n=3$. Los valores representan la media \pm el error estándar de un experimento por duplicado y uno independiente. **HDAC:** Histona desacetilasa, **TSA=** Tricostatina A 1 μ M, **NaB=** Butirato de sodio 30 mM, **E2=** 17 β -estradiol 1 nM, **Vehículo=** DMSO 0.5%.

7.1.3 El AMP γ -tionina regula la transcripción de HDAC1/2/3 en células MCF-7

Posterior a la evaluación del nivel global de H3K9ac y con base en los resultados obtenidos en el ensayo de activación de HDACs, se realizaron ensayos de RT-qPCR para evaluar la expresión del ARNm de las HDAC1/2/3. Para ello, se extrajo el ARN total de células expuestas al vehículo y a γ -tionina durante 6, 12 y 24 h. Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc mediante una reacción de transcripción inversa y se realizó la PCR cuantitativa. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a la expresión del gen endógeno β -actina.

Los resultados mostraron que los niveles de transcrito de HDAC1 y HDAC2 fue inducido por la defensina después de 6 h de tratamiento respecto al vehículo (24 y 13 veces, respectivamente), mientras que el nivel relativo de HDAC3 se

incrementó 3 veces a partir de las 12 h. No obstante, se observó una disminución de la expresión de HDAC1 y HDAC2 en función del tiempo, siendo significativamente menor a las 24 h, 0.4 veces para HDAC1, y 0.6 veces para HDAC3 (Figura 15).

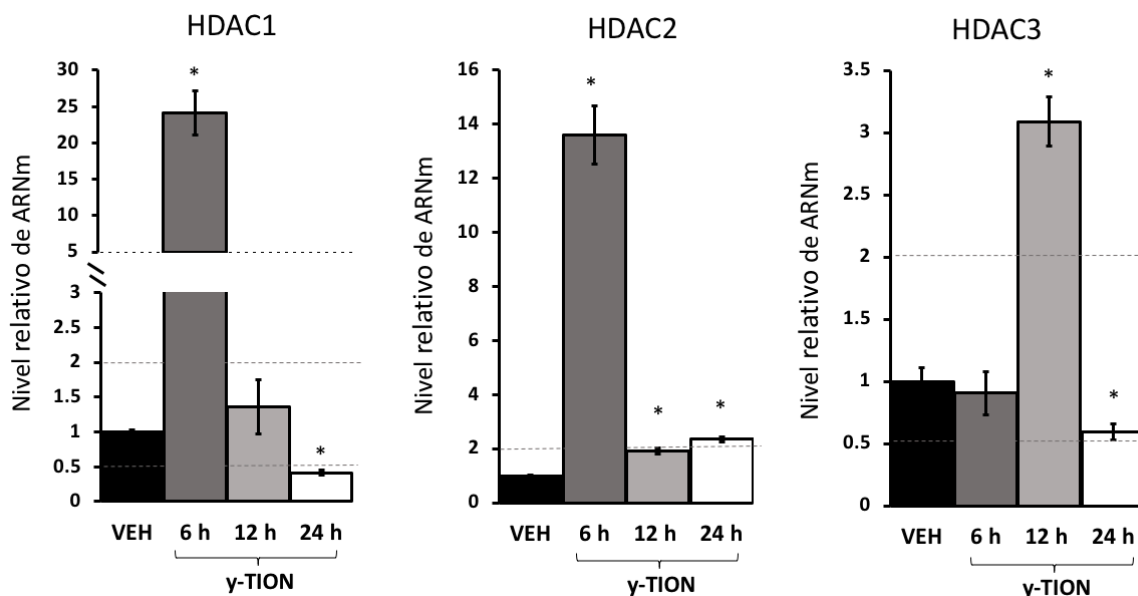


Figura 15. Niveles relativos de expresión génica de HDAC1/2/3 en células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina. Las células fueron tratadas con el AMP durante 6, 12 y 24 h y luego se extrajo el ARN total para la síntesis del ADNc. La expresión se analizó por qPCR. Los datos fueron normalizados respecto a la expresión del gen endógeno β -actina y analizados por el método $\Delta\Delta$ Ct. * Indican diferencia estadística significativa con respecto al vehículo. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. n=4. **VEH**= DMSO 0.5%, **Y-TION**= γ -tionina IC₅₀ (117.29 μ g/ml).

7.1.4 El AMP γ -tionina disminuye la expresión del ARNm del supresor tumoral p53 en células MCF-7

Un componente importante que se ha visto regulado en la apoptosis inducida por algunos compuestos inhibidores de las HDACs es p53, ya que éste puede ser regulado con el propósito de activar los mecanismos de reparación de daño al ADN, por lo cual se procedió a analizar el nivel de transcrito de este

supresor tumoral. Como se puede apreciar en la figura 16, el nivel relativo de ARNm no se modificó de manera significativa a las 6 y a las 12 h, pero si se observó un decremento de 0.5 veces a las 24 h de tratamiento con la defensiva.

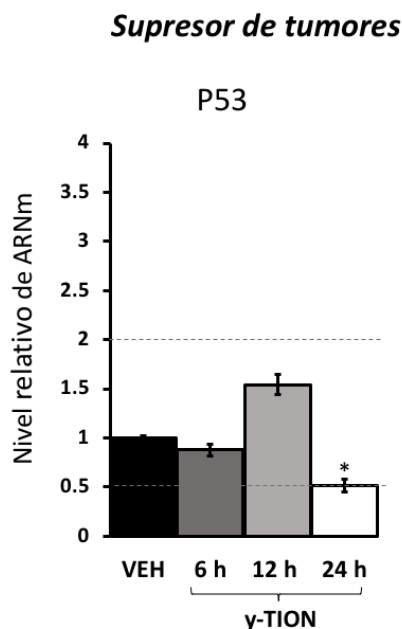


Figura 16. Niveles relativos de la expresión génica de p53 en células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina. Las células fueron tratadas con el AMP durante 6, 12 y 24 h y luego se extrajo el ARN total para la síntesis del ADNc. Datos obtenidos por qPCR, normalizados respecto a la expresión del gen endógeno β -actina y analizados por el método $\Delta\Delta$ Ct. *Indican diferencia estadística significativa con respecto al vehículo. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. n=4. **VEH**= DMSO 0.5%, **Y-TION**= γ -tionina IC₅₀ (117.29 μ g/ml).

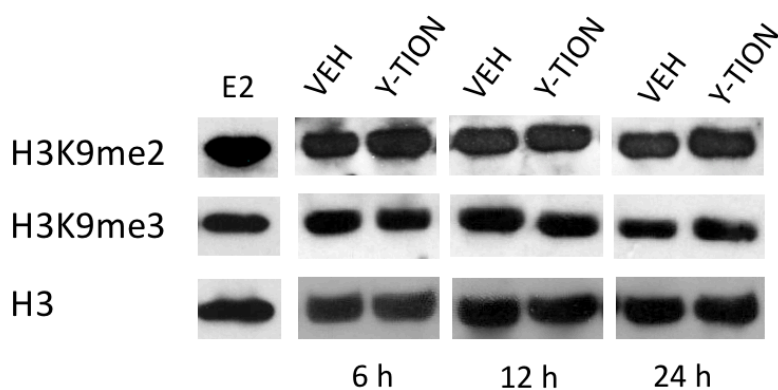
7.2 Evaluación de la modificación H3K9me2/3 en células MCF-7 por el AMP γ -tionina

7.2.1 El AMP γ -tionina aumenta los niveles globales de H3K9me2, pero no de H3K9me3 en células MCF-7

Del mismo modo que la acetilación global de H3K9, se evaluó el nivel de la marca represiva H3K9me3, la cual es una modificación característica de zonas de

heterocromatina, donde el ADN se encuentra fuertemente compactado. Para ello, las células fueron expuestas a los tratamientos con la defensina durante 0, 6, 12 y 24 h. No se observaron cambios significativos entre los tratamientos en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 15). Con base en ello, se evaluó el nivel global de la modificación H3K9me2, la cual es una marca represiva de la transcripción que se ha implicado en el cáncer de mama. El análisis de Western blot mostró un incremento significativo de H3K9me2 en las células tratadas con el AMP a las 24 h (32.45%), mientras que a las 6 y 12 h no se encontraron diferencias respecto al vehículo (Figura 17).

A)



B)

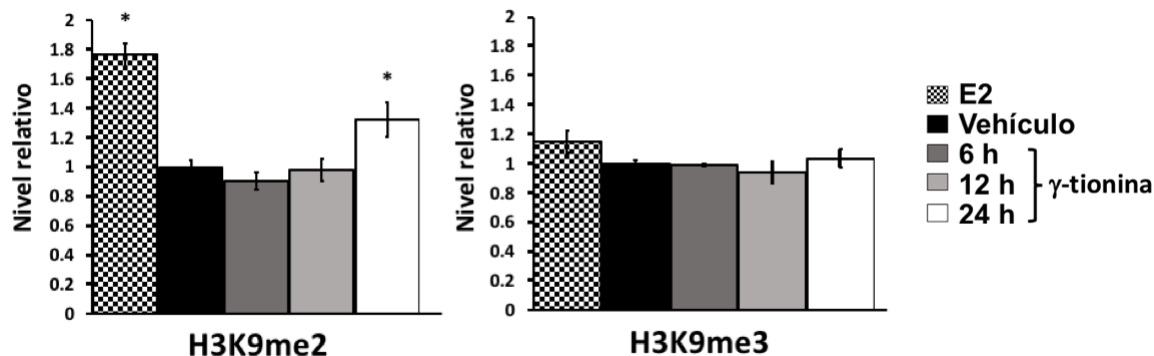


Figura 17. El AMP γ -tionina aumenta los niveles globales de H3K9me2 pero no de H3K9me3 en células MCF-7. Se extrajeron las histonas de células tratadas por 6, 12 y 24 h con la IC₅₀ (117.29 μ g/ml) de γ -tionina. Posteriormente se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de western blot. **A)** Imagen representativa de Western blot, **B)** Análisis densitométrico. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Se utilizó E2 como control positivo de metilación de H3K9. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo. * indican diferencia estadística significativa respecto al vehículo. *t* de student $P \leq 0.05$. $n=4$. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. **E2**= 17 β -estradiol 1 nM, **Vehículo**= DMSO 0.5%.

7.2.2 El AMP γ -tionina disminuye en función del tiempo la transcripción de la histona desmetilasa KDM4A en células MCF-7

Entre las principales enzimas modificadoras de la marca epigenética H3K9me2 se encuentra la histona desmetilasa KDM4A, por lo que a raíz del incremento observado en la evaluación por Western blot, se valoró el nivel de transcrito de la KDM4A mediante qPCR. Como se observa en la figura 18, el nivel de transcripción presentó un aumento significativo a las 6 h (3.22 veces), el cual disminuyó en función del tiempo, siendo notablemente menor a las 24 h de tratamiento con γ -tionina (0.11 veces).

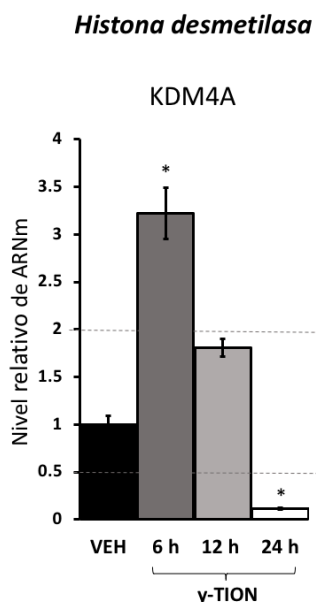


Figura 18. Niveles relativos de expresión génica de KDM4A en células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina. Las células fueron tratadas con el AMP durante 6, 12 y 24 h y luego se extrajo el ARN total para la síntesis del ADNc. Datos obtenidos por qPCR, normalizados respecto a la expresión del gen endógeno β -actina y analizados por el método $\Delta\Delta$ Ct. *Indican diferencia estadística significativa con respecto al vehículo. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. n=4. **VEH**= DMSO 0.5%, **Y-TION**= γ -tionina IC₅₀ (117.29 μ g/ml).

7.2.3 El AMP γ -tionina disminuye en función del tiempo la transcripción del receptor de estrógenos α en células MCF-7

En células MCF-7, la regulación de H3K9me2 mediada por KDM4A se ha asociado con la respuesta a estrógenos, ya que se ha descrito que esta modificación modula el nivel de compactación de la cromatina en diferentes genes blanco del ER α . Por ello, se procedió a medir la expresión del gen *ESR1*, el cual codifica para el ER α . El nivel de transcrito de este receptor se indujo hasta 32.93 veces en los tratamientos con γ -tionina (6 h). Posteriormente, la expresión disminuyó en función del tiempo, presentando un nivel basal a las 12 h y una disminución significativa de 0.5 veces a las 24 h (Figura 19).

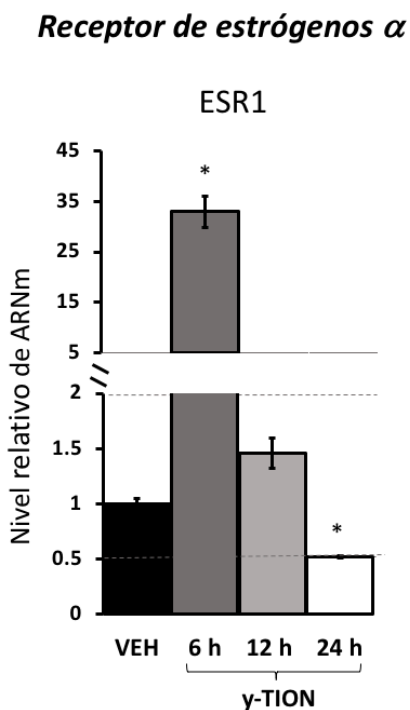


Figura 19. Niveles relativos de la expresión génica de ESR1 en células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina. Las células fueron tratadas con el AMP durante 6, 12 y 24 h y luego se extrajo el ARN total para la síntesis del ADNc. Datos obtenidos por RT-qPCR, normalizados respecto a la expresión del gen endógeno β -actina y analizados por el método $\Delta\Delta$ Ct. *Indican diferencia estadística significativa con respecto al vehículo. Los valores representan la media \pm el error

estándar de dos experimentos por duplicado. n=4. **VEH**= DMSO 0.5%, **Y-TION**= γ -tionina IC₅₀ (117.29 μ g/ml).

7.2.4 El AMP γ -tionina disminuye la transcripción de la ciclina D1 pero no de p21 en células MCF-7

En la regulación estrogénica mediada por KDM4A se ha visto principalmente la modulación de genes blanco del ER α , cuyas funciones se han visto relacionadas con la proliferación. Entre estos genes se encuentra la ciclina D1, por lo que se consideró evaluarla a nivel transcripcional. A través de un análisis de qPCR, se observó un nivel de expresión basal a las 6 y 12 h, mientras que a las 24 h de tratamiento disminuyó significativamente (0.4 veces) (Figura 18). Asimismo, se evaluó el nivel de transcrito de p21, el represor de la ciclina D1; no obstante, los niveles de ARNm se mantuvieron sin modificaciones en todos los tiempos evaluados (Figura 20).

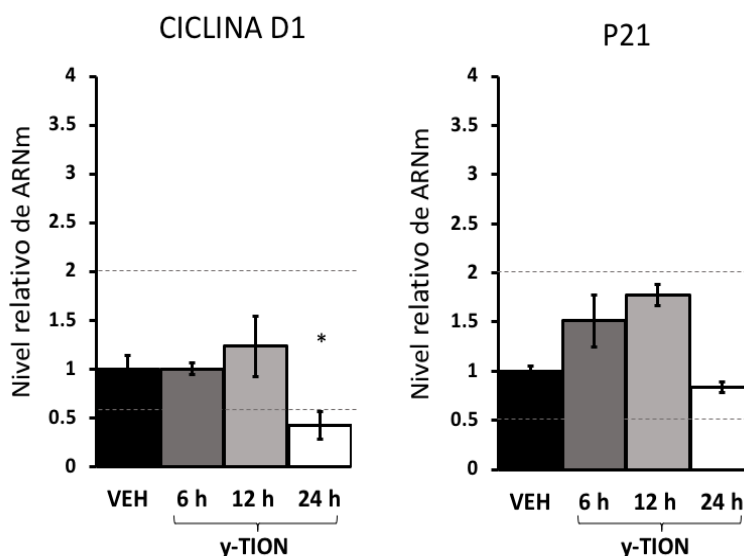


Figura 20. Niveles relativos de expresión génica de ciclina D1 y p21 en células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina. Las células fueron tratadas con el AMP durante 6, 12 y 24 h y luego se extrajo el ARN total para la síntesis del ADNc. Datos obtenidos por qPCR, normalizados respecto a la expresión del gen endógeno β -actina y analizados por el método $\Delta\Delta$ Ct. *Indican diferencia estadística significativa con respecto al vehículo. Los valores representan la media \pm el error

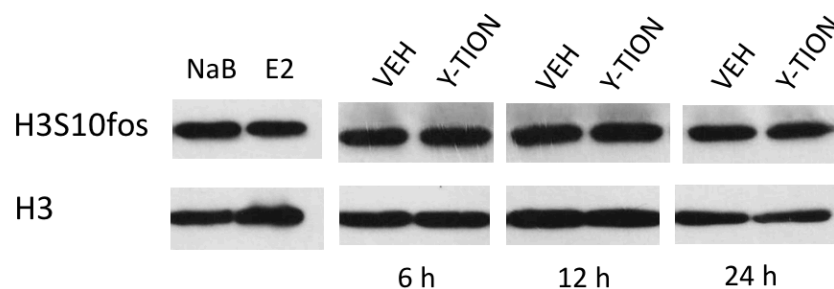
estándar de dos experimentos por duplicado. n=4. **VEH**= DMSO 0.5%, **Y-TION**= γ -tionina IC₅₀ (117.29 μ g/ml).

7.3 Evaluación de la modificación H3S10fos en células MCF-7 por el AMP γ -tionina

7.3.1 El AMP γ -tionina no regula la fosforilación de H3S10 en células MCF-7

La fosforilación de la serina 10 se ha asociado principalmente con la proliferación celular debido a su participación en los procesos mitogénicos, por lo que a través de un ensayo de Western blot se evaluó el nivel global de esta modificación. Se realizaron evaluaciones a las 0, 6, 12 y 24 h. Como se observa en la figura 21, no se detectaron cambios significativos en ninguno de los tratamientos con γ -tionina respecto al vehículo.

A)



B)

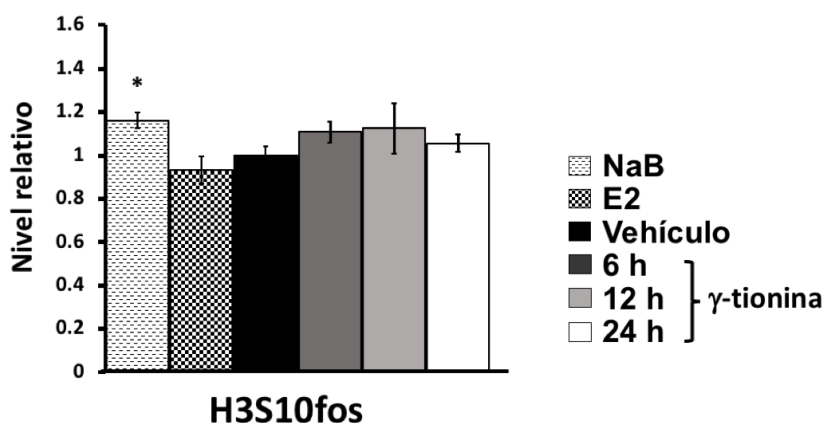


Figura 21. El AMP γ -tionina no regula la fosforilación de la H3S10 en células MCF-7. Se extrajeron las histonas de células tratadas por 6, 12 y 24 h con la IC₅₀ (117.29 μ g/ml) de γ -tionina. Posteriormente se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de western blot. **A)** Imagen representativa de Western blot, **B)** Análisis densitométrico. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Se utilizó NaB como control positivo y E2 como control negativo de fosforilación de H3S10. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo. * indican diferencia estadística significativa respecto al vehículo. *t* de student $P \leq 0.05$. $n=4$. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. **NaB**= Butirato de sodio 30 mM, **E2**= 17 β -estradiol 1 nM, **Vehículo**= DMSO 0.5%.

7.3.2 El AMP γ -tionina regula diferencialmente la transcripción de la cinasa Aurora B en células MCF-7

Entre las principales cinasas encargadas de fosforilar a H3S10, se encuentra Aurora B, la cual es codificada por el gen *AURKB*, por lo que se analizó su expresión en células MCF-7 expuestas a diferentes tiempos con γ -tionina. Tras la evaluación, se observó un incremento notable cercano a 2 veces en el nivel de expresión de este gen, mientras que a las 24 h se encontró una disminución significativa (0.4 veces) (Figura 22), con respecto al vehículo.

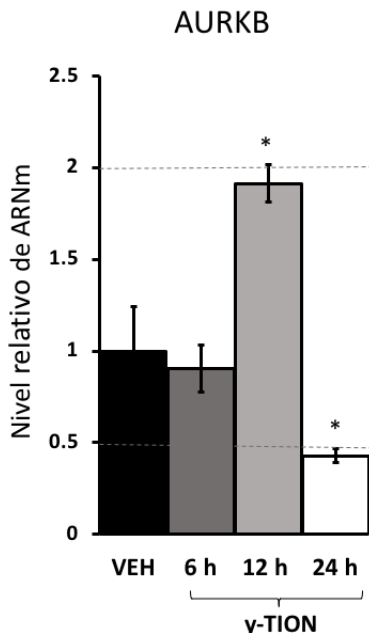


Figura 22. Niveles relativos de la expresión génica de *AURKB* en células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina. Las células fueron tratadas con el AMP durante 6, 12 y 24 h y luego se extrajo el ARN total para la síntesis del ADNc. Datos obtenidos por qPCR, normalizados respecto a la expresión del gen endógeno β -actina y analizados por el método $\Delta\Delta$ Ct. *Indican diferencia estadística significativa con respecto al vehículo. Los valores representan la media \pm el error estándar de dos experimentos por duplicado. n=4. **VEH**= DMSO 0.5%, **Y-TION**= γ -tionina IC₅₀ (117.29 μ g/ml).

VIII. DISCUSIÓN

Las alteraciones epigenéticas de las histonas, especialmente aquellas relacionadas con las modificaciones de la histona 3, han cobrado gran relevancia en el estudio del desarrollo y la progresión del cáncer, con el fin de encontrar nuevos blancos terapéuticos que mejoren el tratamiento y las expectativas de la enfermedad. Con base en ello, se sigue en la búsqueda de moléculas alternativas que disminuyan los inconvenientes de las terapias tradicionales. En este sentido, se ha puesto especial atención a los péptidos antimicrobianos de origen vegetal, ya que un alto porcentaje de éstos ha mostrado actividad citotóxica en células cancerosas (Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

En trabajos previos del grupo de trabajo se reportó que la defensina γ -tionina, identificada en el chile habanero (*Capsicum chinense*), redujo significativamente la viabilidad de diferentes líneas de células cancerosas (Anaya-López et al., 2006; Flores-Álvarez, datos no publicados; Velázquez-Hernández, 2017; Guzmán-Rodríguez, 2016); entre éstas se encuentran las células de cáncer de mama MCF-7, en las cuales este péptido favoreció la activación de la apoptosis por ambas vías, intrínseca y extrínseca (Guzmán-Rodríguez, 2016). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la inducción de la apoptosis en células MCF-7 está relacionada con una regulación epigenética. Por ello, en este trabajo se caracterizaron algunas modificaciones epigenéticas de la histona H3, como H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos en estas células.

Los resultados mostraron que el AMP γ -tionina induce un incremento global en la acetilación de H3K9 a las 24 h de exposición al tratamiento, pero no a tiempos cortos (Figura 13). La capacidad de modular a nivel epigenético no se ha estudiado en AMPs. Existen reportes donde se han encontrado cambios en los niveles de acetilación desde las 6 h en diferentes residuos inducidos por SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida) en células MCF-7, principalmente H3K14, H3K16 y H3K9, observando un incremento de la acetilación de forma dependiente del tiempo (Conti et al., 2010). De manera relevante, se observó una inhibición de la actividad de las HDACs en las células tratadas con el AMP γ -tionina, siendo

mayor el efecto inhibitorio a las 6 h de tratamiento (Figura 14). Este resultado se correlaciona con el aumento global de la marca H3K9ac a las 24 h, ya que la inhibición de las HDACs puede favorecer este incremento. Por lo anterior, sería importante evaluar si otras marcas de acetilación de histonas pudieran estar siendo inducidas también por la defensina γ -tionina. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer reporte que demuestra que un AMP puede inducir la acetilación de la histona H3, además de actuar como un inhibidor de HDACs (HDACi).

Sin embargo, se observa una disminución en la inhibición de las HDACs de forma dependiente del tiempo (Figura 14). Se ha demostrado que algunos AMPs como la indolicina pueden ser degradados en eritrocitos humanos por proteasas citosólicas de forma tiempo-dependiente (Starr y Wimley, 2017), por lo que es importante considerar si γ -tionina es degradada en las células MCF-7 y por ende, disminuya su capacidad de inhibir la actividad de las HDACs a tiempos más prolongados.

Por otro lado, se ha reportado que los HDACi como SAHA, TSA (Trisostatina A) y DIM (3,3'-diindolilmetano) pueden inhibir la actividad de las HDACs a través de un efecto dual, ya que bloquean el sitio catalítico de la enzima, y disminuyen la expresión del gen que codifica para la enzima (Beaver et al., 2012; Lee et al., 2012). En este trabajo, al analizar la expresión del ARNm de las histona desacetilasas HDAC1, HDAC2 y HDAC3, se observó una disminución significativa en la expresión de las 3 enzimas a las 24 h (Figura 15). Sin embargo, sería importante corroborar este comportamiento también a nivel de proteína.

La actividad de HDACi reportada en este trabajo para el AMP γ -tionina es una característica atractiva de esta molécula en la búsqueda de alternativas terapéuticas. La razón de ello es que en muchos tipos de cáncer, entre ellos el de mama, existe una disminución de los niveles de acetilación ocasionada por una sobreexpresión de las enzimas HDACs, lo cual conduce a una represión transcripcional de muchas vías supresoras de tumores que involucran principalmente a proteínas reguladoras del ciclo celular y a rutas de reparación del ADN (Khan et al., 2012; Luo et al., 2011; Monette et al., 2004). Por ello, el incremento en los niveles de acetilación de las histonas, como el ejercido por el

AMP γ -tionina en las células MCF-7, favorece a que la célula reestablezca su capacidad para activar diferentes mecanismos que conduzcan a la apoptosis (Ceccacci y Minucci, 2016). Esto coincide con lo reportado en un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, donde se demostró que el AMP γ -tionina activa la apoptosis en células MCF-7 (Guzmán-Rodríguez, 2016).

MCF-7 es una línea celular que tiene al gen *p53* silvestre, el cual regula diversos genes blanco importantes en la respuesta a daño al ADN (Leroy et al., 2014). Esto se ha asociado el incremento en la acetilación de H3K9 (Léveillé et al., 2015). Sin embargo, en este trabajo se observó una disminución en el nivel de transcrito de *p53* (Figura 16), por lo que el incremento global de acetilación inducido por γ -tionina no depende por *p53*. No obstante, se ha reportado que diversos HDACi, como SAHA y TSA, pueden activar otros mecanismos letales en las células cancerosas, como la inducción de daño al ADN (por efecto de ROS) y la supresión de las vías de reparación de daño al ADN (Bose et al., 2014). Estudios previos del grupo de trabajo demuestran que existe un incremento de ROS en las células MCF-7 expuestas al AMP γ -tionina (Guzmán-Rodríguez, datos no publicados). Asimismo, se conoce que el aumento en la acetilación global de diferentes residuos de histonas, en conjunto con un incremento en la producción de ROS, propician la generación de “nicks” (cortes en el ADN), lo que genera un estado flexible de la cromatina que provoca daño al ADN y un descontrol generalizado de los sistemas, conduciendo finalmente a la apoptosis (Perillo et al., 2015). En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que el mecanismo mediante el cual el AMP γ -tionina induce la apoptosis en las células MCF-7 está relacionado con el incremento de la acetilación de H3.

Por otro lado, con base en el incremento del nivel de H3K9ac observado, se evaluó el nivel de la marca H3K9me3. De manera general se considera que si la marca H3K9ac se incrementa, su contraparte H3K9me3 disminuye (Allegrucci et al., 2011; Chekhun et al., 2007). Sin embargo, los resultados mostraron que el AMP γ -tionina no modificó los niveles de la marca H3K9me3 en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 17). En el mismo sentido, se ha reportado que células de cáncer parcialmente diferenciadas, como MCF-7, no presentan cambios

importantes en los niveles de esta marca en comparación con células totalmente indiferenciadas como MDA-MB-231 (Jehanno et al., 2017). Asimismo, la trimetilación de H3K9 se ha localizado principalmente en zonas de heterocromatina fuertemente compactada, considerándose muy estable (Wang et al., 2007).

Interesantemente, en el presente estudio se observó un incremento global de H3K9me2 (Figura 17), así como una disminución del transcrito de la histona desmetilasa de H3K9me2/3 KDM4A, a las 24 h de tratamiento con el péptido (Figura 18). En células MCF-7 se ha observado que diversas histona-desmetilasas (ej. LSD1, KDM3A y KDM4B) ejercen una regulación positiva sobre la transcripción mediada por el receptor de estrógenos α , al facilitar la unión del receptor a los ERE (Elementos de Respuesta a Estrógenos) a través de la desmetilación de H3K9me1/2 (Kawazu et al., 2011; Perillo et al., 2008; Wade et al., 2015). Por ello, se analizó la expresión de *Esr1*, el gen codificante para el ER α , encontrándose una inducción de este gen a las 6 h, la cual disminuyó significativamente a las 24 de tratamiento (Figura 19). En este sentido, se han encontrado altos niveles globales de H3K9me2 en células carentes de KDM3A o con baja expresión (Wade et al., 2015), lo cual coincide con este trabajo. De forma adicional, mediante el uso de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se ha reportado un incremento de la marca H3K9me2 en EREs y una disminución en la expresión de genes blanco del ER α , como PS2 y GREB1, los cuales generalmente se asocian a proliferación celular (Wade et al., 2015). Asimismo, otros genes blanco del ER α regulados por esta dinámica son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el receptor de progesterona y la ciclina D1 (Heldring et al., 2007). En este trabajo se evaluó la expresión de la ciclina D1 debido al papel que tiene en el control del ciclo celular. Los resultados mostraron una inhibición en la transcripción de este gen a las 24 h de tratamiento con γ -tionina (Figura 20), lo que sugiere que el incremento en la marca H3K9me2 pudiera estar participando en esta regulación, como se ha reportado previamente. En el mismo sentido, existen reportes que indican la participación de p21 en la regulación de la expresión de la ciclina D1 mediada por la regulación epigenética

de H3K9 (Alzoubi et al., 2016; Li et al., 2006); sin embargo, en este estudio no se observaron cambios en la expresión de *p21* a nivel de ARNm (Figura 18), lo que soporta la idea de que el bajo nivel de transcripción de la ciclina D1 pudiera estar mediada por la regulación H3K9me2/KDM4A/ER α . No obstante, se requiere de experimentos adicionales para dilucidar esta regulación, lo cual deberá incluir el análisis a nivel de proteína. Es importante considerar que los tumores mamarios que expresan ER α tienen un mejor pronóstico de la enfermedad así como una mejor respuesta a las terapias hormonales (Lumachi et al., 2015). A pesar de ello, una proporción significativa de tumores ER positivos son resistentes a terapias hormonales como el tamoxifeno desde el primer tratamiento o después de un tratamiento inicial exitoso (Platet et al., 2004). Por esta razón, la modulación de vías relacionadas con ER α por la defensina γ -tionina, constituye una característica muy atractiva.

Por otro lado, en este trabajo también se valoró la participación de H3S10fos en la apoptosis inducida por γ -tionina en células MCF-7, debido a que se ha reportado su participación en el incremento de H3K914ac y H3K9ac (Simboeck et al., 2010). Asimismo, se ha propuesto que H3S10fos, además de intervenir en la mitosis, regula la activación transcripcional al controlar el nivel de metilación de su lisina precedente (H3K9) debido a la inhibición del reclutamiento de factores de histona-metiltransferasas al sitio de reconocimiento (Sawicka y Seiser, 2012). Entre las principales enzimas que intervienen en la regulación de H3S10fos se encuentra la cinasa Aurora B (Zhang y Pradhan, 2014). Por lo anterior, se evaluó la marca H3S10fos y la expresión de Aurora B. No se detectaron cambios significativos en los niveles de H3S10fos en ninguno de los tratamientos (Figura 21), mientras que para la cinasa se observó un incremento en la expresión a las 12 h y una disminución a las 24 h (Figura 22). Existe evidencia que indica la participación de Aurora B en otras rutas de regulación, como la ruta de las MAPK/ERK en células de melanoma (Bonet et al., 2012). En el grupo de trabajo se reportó que la defensina vegetal PaDef induce significativamente la fosforilación de la cinasa p38 en células MCF-7, lo que en conjunto con la inducción de la despolarización de la membrana mitocondrial y el aumento en la

expresión de genes como *citocromo c*, *apaf 1* y *caspasa 9*, se asocia con la inducción de apoptosis por la vía intrínseca (Guzmán-Rodríguez et al., 2013). Con base en ello, se necesitarían más experimentos para determinar si el AMP γ -tionina activa rutas de las MAPK cinasas y si Aurora B está involucrada en ellas, ya que, con esta defensina los genes relacionados a la vía intrínseca de apoptosis (*citocromo 6*, *apaf1* y *caspasa 9*) se vieron mayormente incrementados en tiempos cortos (6 h), mientras que a las 24 h no hubo cambios significativos en su expresión (Guzmán-Rodríguez, 2016).

Por último, es importante señalar que hasta el momento este es el primer trabajo que describe a un AMP vegetal como modulador epigenético con actividad inhibitoria de HDACs, con lo cual se abre la puerta a diferentes posibilidades que pueden ser aprovechadas en el diseño de una molécula que pueda usarse como terapia en el tratamiento del cáncer. Respecto a ello, diversos estudios recalcan la importancia de usar terapias combinadas que modulen epigenéticamente componentes clave de la señalización celular; por ejemplo, el uso de HDACi, entre los que se encuentra SAHA, en combinación con el tamoxifeno para reducir la resistencia a éste (Renoir et al., 2013; Tang et al., 2015). En este sentido, en el grupo de trabajo se demostró que el AMP γ -tionina sensibilizó a células HCT116 de cáncer de colon a la muerte inducida por NaB (Velázquez-Hernández, 2017). Aunque aún hace falta más evidencia experimental que otorgue más información sobre el mecanismo molecular y la dinámica epigenética de las marcas H3K9ac, H3K9me2/3 y H3S10fos asociada a la apoptosis inducida por el AMP γ -tionina en células MCF-7, en la siguiente figura se integran los resultados obtenidos hasta este momento:

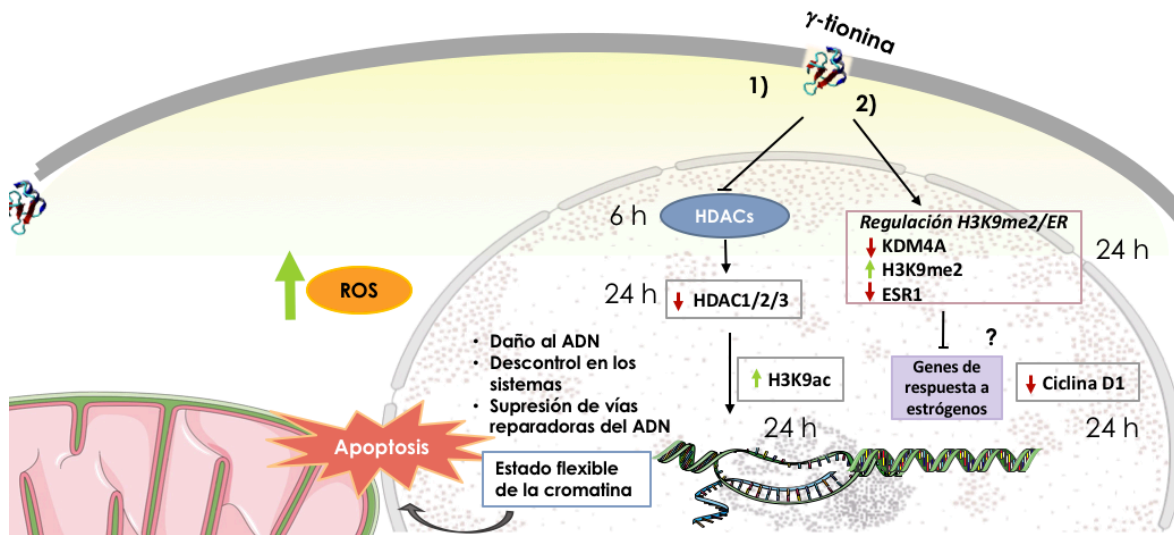


Figura 23. Modelo de integración de la regulación epigenética de las marcas H3K9ac y H3K9me2 asociadas a la citotoxicidad del AMP γ -tionina en células MCF-7. El análisis estructural *in silico* de la defensina γ -tionina sugiere que, de acuerdo a las características de la molécula, se podría favorecer la formación de poros transitorios que permitan la internalización de la molécula y se desencadene la apoptosis (Guzmán-Rodríguez, 2016). 1) El AMP γ -tionina inhibe la actividad de las HDACs en tiempos tempranos, además de que regula negativamente la transcripción de HDAC1/2/3 en tiempos largos, lo cual conduce a un incremento global en H3K9ac. Este estado puede generar un estado flexible de la cromatina que propicie el daño al ADN y en conjunto con el aumento en las ROS favorecer la activación de la apoptosis. 2) Por otro lado, la defensina γ -tionina disminuye el transcrito de KDM4A favoreciendo el incremento de H3K9me2, lo cual se ha relacionado con una disminución del ER α y con la represión transcripcional de los genes blancos regulados por éste. Además, el AMP γ -tionina inhibe la expresión del gen codificante de ER α , así como de la ciclina D1, lo cual sugiere que podría estar relacionado con una disminución en la proliferación celular.

IX. CONCLUSIONES

La defensina γ -tionina incrementa a nivel global de H3K9ac y H3K9me2 en células de cáncer de mama MCF-7 e inhibe la actividad enzimática de las HDACs. Adicionalmente regula la transcripción de las enzimas modificadoras HDAC1/2/3 y KDM4A. En conjunto, esto puede estar asociado a su actividad citotóxica en células de cáncer de mama con respuesta a estrógenos, ya que modula la transcripción del receptor de estrógenos α . Este es el primer trabajo que evalúa a un AMP vegetal a nivel epigenético.

X. REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (5th ed.). Abingdon, UK: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Allegrucci, C., Rushton, M. D., Dixon, J. E., Sottile, V., Shah, M., Kumari, R., ... Johnson, A. D. (2011). Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts. *Molecular Cancer*, *10*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-7>
- Aluru, M., Curry, J., & O'Connell, M. (1998). Nucleotide sequence of a defensin or γ -thionin-like gene (accession no. AF128239) from habanero chile (99-070). *Plant Physiology*, *120*(633).
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. (2012). Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Veterinary Microbiology*, *155*(2–4).
- Alzoubi, S., Brody, L., Rahman, S., Mahul-Mellier, A.-L., Mercado, N., Ito, K., ... Hajji, N. (2016). Synergy between histone deacetylase inhibitors and DNA-damaging agents is mediated by histone deacetylase 2 in colorectal cancer. *Oncotarget*, *7*(28), 44505–44521. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9887>
- Anaya-López, J. L. (2006). *Actividad antifúngica y citotóxica de la defensina γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) producida por células endoteliales bovinas*. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E., Baizabal-Aguirre, V. M., Cano-Camacho, H., & Ochoa-Zarzosa, A. (2006). Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnology Letters*, *28*(14), 1101–1108. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9060-4>
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, *6*(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395.

<https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>

- Bardelli, A., Saha, S., Sager, J. A., Romans, K. E., Xin, B., Markowitz, S. D., ... Vogelstein, B. (2003). PRL-3 Expression in Metastatic Cancers. *Clinical Cancer Research*, 9(15), 5607–5615. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
- Bargou, R., Daniel, P., Mapara, M., Bommer, K., Wagener, C., Kallinich, B., ... Dorken, B. (1995). Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: Low bax- α expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *International Journal Of Cancer*, 60(6), 854–859.
- Baxter, A. A., Poon, I. K., & Hulett, M. D. (2017). The plant defensin NaD1 induces tumor cell death via a non-apoptotic, membranolytic process. *Cell Death Discovery*, 3(102). <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.102>
- Baxter, A. A., Richter, V., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Adda, C. G., Veneer, P. K., ... Hulett, M. D. (2015). The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis. *Molecular and Cellular Biology*, 35(11), 1964–1978. <https://doi.org/10.1128/MCB.00282-15>
- Beaver, L. M., Yu, T. W., Sokolowski, E. I., Williams, D. E., Dashwood, R. H., & Ho, E. (2012). 3,3'-Diindolylmethane, but not indole-3-carbinol, inhibits histone deacetylase activity in prostate cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(3), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.007>
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors, 5(September), 769–784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>
- Bonet, C., Giuliano, S., Ohanna, M., Bille, K., Allegra, M., Lacour, J., ... Bertolotto, C. (2012). Aurora B Is Regulated by the Mitogen-activated Protein Kinase / Extracellular Signal-regulated Kinase (MAPK / ERK) Signaling Pathway and Is a Valuable Potential Target in Melanoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 29887–29898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371682>
- Boohaker, R. J., Lee, M. W., Vishnubhotla, P., Perez, J. M., & Khaled, A. R. (2012). The Use of Therapeutic Peptides to Target and to Kill Cancer Cells.

-
- Curr Med Chem*, 19(22), 3794–3804. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4749027&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Cao, L.-L., Changchun, S., & Wei-Guo, Z. (2016). Histone modifications in DNA damage response. *Science China, Life Sciences*, 159(3), 257–270. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5011-z>
- Cassileth, B. R., & Deng, G. (2004). Complementary and Alternative Therapies for Cancer. *The Oncologist*, 9, 80–89. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-1-80>
- Ceccacci, E., & Minucci, S. (2016). Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: Lessons from leukaemia. *British Journal of Cancer*, 114(6), 605–611. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.36>
- Chekhun, V. F., Lukyanova, N. Y., Kovalchuk, O., Tryndyak, V. P., & Pogribny, I. P. (2007). Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(3), 1089–1098. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0663>
- Conti, C., Leo, E., Eichler, G. S., Sordet, O., Martin, M. M., Fan, A., ... Pommier, Y. (2010). Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage. *Cancer Research*, 70(11), 4470–4480. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3028>
- Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in Male Physiology. *Physiological Reviews*, 97(3), 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>
- De Coninck, B., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2013). Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.10.002>
- Díaz-Murillo, V., Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides*, 78, 109–118.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.02.008>

Dueñas-González, A., Candelaria, M., Perez-plascencia, C., Perez-cardenas, E., Cruz-hernandez, E. De, & Herrera, L. A. (2008). Valproic acid as epigenetic cancer drug : Preclinical , clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treatments Reviews*, 206–222.

<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.11.003>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews. Genetics*, 8(4), 286–298. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>

Esteller, M. (2011). Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports*, 3(9). <https://doi.org/10.3410/B3-9>

Falkenberg, K. J., & Johnstone, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 673–691. <https://doi.org/10.1038/nrd4360>

Fischer, U., & Schulze-Osthoff, K. (2005). Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death and Differentiation*, 12 Suppl 1, 942–961. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401556>

Flores-Álvarez, L. (n.d.). *Las defensinas de plantas PaDef (Persea americana var. drymifolia) y y-tionina (Capsicum chinense) muestran actividad citotóxica en líneas celulares de leucemia.*

Fox, J. L., & MacFarlane, M. (2016). Targeting cell death signalling in cancer: minimising “Collateral damage.” *British Journal of Cancer*, (November 2015), 1–7. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.111>

Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25, 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>

Füllgrabe, J., Kavanagh, E., & Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene*, 30(31), 3391–3403. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.121>

Galvez, A. F., Chen, N., Macasieb, J., & De Lumen, B. O. (2001).

- Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Research*, 61(20), 7473–7478.
- Gaspar, D., Veiga, S., & Castanho, M. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, 4, 24–39.
- Geutjes, E.-J., Bajpe, P. K., & Bernards, R. (2012). Targeting the epigenome for treatment of cancer. *Oncogene*, 31(34), 3827–44. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.552>
- GLOBOCAN. (2012). Incidencia, mortalidad y prevalencia mundial de Cáncer. Retrieved May 27, 2016, from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- Guzmán-Rodríguez, J. J. (2016). *Citotoxicidad de las Defensinas PaDef (Persea americana var. drymifolia) y Y-tionina (Capsicum chinense) contra la Línea Celular de Cáncer de Mama MCF-7*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>
- Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L. M., Salgado-Garciglia, R., Rodríguez-Zapata, L. C., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2013). Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/986273>
- Guzmán-rodríguez, J. J., Ochoa-zarzosa, A., López-gómez, R., & López-meza, J. E. (2015). Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents, 2015(1).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hayes, B. M. E., Bleackley, M. R., Wiltshire, J. L., Anderson, M. A., Traven, A., & Van Der Weerden, N. L. (2013). Identification and mechanism of action of the plant defensin Nad1 as a new member of the antifungal drug arsenal against candida albicans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3667–3675. <https://doi.org/10.1128/AAC.00365-13>
- Heiden, M. G. Vander, Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: Cell Proliferation. *Science*, 324(May), 1029. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Treuter, E., ... Stro, A. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiology Review*, 87, 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>
- Holliday, R. (2006). Epigenetics, a Historical Overview. *Epigenetics*, 1(2), 76–80.
- INEGI, I. N. de E. y G. (2015). *Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)*. Aguascalientes, Aguascalientes.
- Jackson, S. J. T., & Singletary, K. W. (2004). Sulforaphane Inhibits Human MCF-7 Mammary Cancer Cell Mitotic Progression and Tubulin Polymerization 1,2. *J. Nutrition and Cancer*, 134(June 2004), 2229–2236.
- Jehanno, C., Flouriot, G., Le Goff, P., & Michel, D. (2017). A model of dynamic stability of H3K9me3 heterochromatin to explain the resistance to reprogramming of differentiated cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(2), 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.11.006>
- Jin, B. J., Hyung, J. J., Jae, H. P., Sun, H. L., Jeong, R. L., Hee, K. L., ... De Lumen, B. O. (2007). Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10707–10713. <https://doi.org/10.1021/jf072363p>
- Jin, X., Mei, H., Li, X., Ma, Y., Zeng, A. H., Wang, Y., ... Zhu, J. (2010). Apoptosis-inducing activity of the antimicrobial peptide cecropin of *Musca domestica* in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 and the possible

- mechanism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(4), 259–265.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmq021>
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128(4), 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>
- Jovanovic, J., Ronneberg, J., Tost, J., & Kristensen, V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology*, 4(3), 242–254.
- Kailash, U., Soundararajan, C. C., Lakshmy, R., Arora, R., Vivekanandhan, S., & Das, B. C. (2006). Telomerase activity as an adjunct to high-risk human papillomavirus types 16 and 18 and cytology screening in cervical cancer. *British Journal of Cancer*, 95(9), 1250–7. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603375>
- Kanherkar, R. R., Bhatia-Dey, N., & Csoka, A. B. (2014). Epigenetics across the human lifespan. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2(September), 49. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00049>; [10.3389/fcell.2014.00049](https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00049)
- Kawazu, M., Saso, K., Tong, K. I., McQuire, T., Goto, K., Son, D. O., ... Okada, H. (2011). Histone demethylase JMJD2B functions as a co-factor of estrogen receptor in breast cancer proliferation and mammary gland development. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017830>
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., & Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73(8), 2013–2026. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940415\)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J)
- Khan, S. A., Amnekar, R., Khade, B., Barreto, S. G., Ramadwar, M., Shrikhande, S. V., & Gupta, S. (2016). p38-MAPK/MSK1-mediated overexpression of histone H3 serine 10 phosphorylation defines distance-dependent prognostic value of negative resection margin in gastric cancer. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0255-9>
- Khan, S. I., Aumsuwan, P., Khan, I. A., Walker, L. A., & Dasmahapatra, A. K. (2012). Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1), 61–73. <https://doi.org/10.1021/tx200378c>

-
- Lay, F. T. (2003). Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia. *Plant Physiology*, 131(3), 1283–1293. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016626>
- Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P.-Y., Campisi, J., & Wiley, C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *British Journal of Cancer*, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.115>
- Lee, H.-R., Kim, T.-H., & Choi, K.-C. (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Laboratory Animal Research*, 28(2), 71. <https://doi.org/10.5625/lar.2012.28.2.71>
- Lee, R. S., Pirooznia, M., Guintivano, J., Ly, M., Ewald, E. R., Tamashiro, K. L., ... Potash, J. B. (2015). Search for common targets of lithium and valproic acid identifies novel epigenetic effects of lithium on the rat leptin receptor gene. *Translational Psychiatry*, 5(7), 1–10. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.90>
- Lee, Y. J., Won, A. J., Lee, J., Jung, J. H., Yoon, S., Lee, B. M., & Kim, H. S. (2012). Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Medical Sciences*, 9(10), 881–893. <https://doi.org/10.7150/ijms.5011>
- Leroy, B., Girard, L., Hollestelle, A., Minna, J. D., Gazdar, A. F., & Soussi, T. (2014). Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: A reassessment. *Human Mutation*, 35(6), 756–765. <https://doi.org/10.1002/humu.22556>
- Lester, B. M., Tronick, E., Nestler, E., Abel, T., Kosofsky, B., Kuzawa, C. W., ... Wood, M. A. (2011). Behavioral epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1226(1), 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06037.x>
- Léveillé, N., Melo, C. A., Rooijers, K., Díaz-Lagares, A., Melo, S. A., Korkmaz, G., ... Agami, R. (2015). Genome-wide profiling of p53-regulated enhancer RNAs uncovers a subset of enhancers controlled by a lncRNA. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7520>
- Li, Y., Li, Y., Kao, G. D., Kao, G. D., Garcia, B. a, Garcia, B. a, ... Lazar, M. a.

- (2006). A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity. *Genes & Development*, 2566–2579. <https://doi.org/10.1101/gad.1455006.in>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., & Amon, A. (2013). *Molecular Cell Biology*. (Freeman and Company, Ed.) (7th editio). New York, United States of America.
- Loeza A, H., López M, J. E., & Ochoa Zarzosa, A. (2010). Efecto del medio condicionado de células endoteliales que expresan el péptido antimicrobiano tionina Thi2.1 de Arabidopsis thaliana sobre aislamientos de Staphylococcus aureus. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(2), 36–41.
- Lopez, J., Percharde, M., Coley, H. M., Webb, A., & Crook, T. (2009). The context and potential of epigenetics in oncology. *British Journal of Cancer*, 100(4), 571–7. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604930>
- Lovrei, L., Maver, A., Zadel, M., & Peterli, B. (2013). The Role of Epigenetics in Neurodegenerative Diseases. In *Neurodegenerative Diseases*. <https://doi.org/10.5772/54744>
- Lumachi, F., Santeufemia, D., & Basso, S. (2015). Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 231. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.231>
- Luo, X.-G., Guo, S., Guo, Y., & Zhang, C.-L. (2011). Histone Modification and Breast Cancer. In *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis* (Vol. 385). <https://doi.org/10.5772/24308>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., ... Weinberg, R. A. (1997). hEST2, the Putative Human Telomerase

- Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization. *Cell*, 90(4), 785–795. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80538-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80538-3)
- Monette, L., Bagrel, R., Laurent, R., Sandra, B., Eric, O., Denyse, B., ... Grant, S. (2004). The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress. *International Journal of Oncology*, 25(6), 1701–1711.
- Montenegro, M. F., Sanchez-del-Campo, L., Fernandez-Perez, M. P., Saez-Ayala, M., Cabezas-Herrera, J., & Rodriguez-Lopez, J. N. (2015). Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. *Oncogene*, 34(2), 135–143. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.605>
- Morey, J., Ryan, J., & Van Dolah, F. (2006). Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8(1), 175–193.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213–219. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>
- Perillo, B., Di Santi, A., Cenera, G., Ombra, M. N., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2014). Phosphorylation of H3 serine 10 by IKK α governs cyclical production of ROS in estrogen-induced transcription and ensures DNA wholeness. *Cell Death and Differentiation*, 21(9), 1503. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.91>
- Perillo, B., Ombra, M., Bertoni, A., Cuozzo, C., Sachetti, S., Sasso, A., & Chiari, L. (2008). DNA Oxidation as Triggered by H3K9me2 Demethylation Drives Estrogen-Induced Gene Expression. *Science*, 319(5860), 202–206.
- Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M., & Garcia, M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: A dual role in cancer proliferation and invasion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.02.001>
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., & Sklar, L. A. (2007). GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265–

-
- 266(SUPPL.), 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.010>
- Ratovitski, E. (2015). Anticancer Natural Compounds as Epigenetic Modulators of Gene Expression. *Current Genomics*, 18(January), 3–26. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160803165229>
- Renoir, J.-M., Marsaud, V., & Lazennec, G. (2013). Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, 85(4), 449–465. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.018>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Park, B., Goel, A., & Aggarwal, B. B. (2011). Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. *Genes and Nutrition*, 6(2), 93–108. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0222-1>
- Richardson, A., de Antueno, R., Duncan, R., & Hoskin, D. W. (2009). Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.083>
- Rodrigues, E. G., Dobroff, A. S. S., Cavarsan, C. F., Paschoalin, T., Nimrichter, L., Mortara, R. A., ... Travassos, L. R. (2008). Effective Topical Treatment of Subcutaneous Murine B16F10-Nex2 Melanoma By the Antimicrobial Peptide Gomesin. *Neoplasia*, 10(1), 61–68. <https://doi.org/10.1593/neo.07885>
- Saldanha, S. N., Kala, R., & Tollefsbol, T. O. (2014). Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate. *Experimental Cell Research*, 324(1), 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.024>
- Sancho, P., Barneda, D., & Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British Journal of Cancer*, (April), 1–8. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>
- Sawicka, A., & Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation - A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, 94(11), 2193–2201. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.018>
- Schnekenburger, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2014). Plant-derived epigenetic modulators for cancer treatment and prevention. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1123–1132. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.009>

- Seyfried, T., & Huysentruyt, L. (2013). On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical ReviewsTM in Oncogenesis*, 18(1–2), 43–73.
- Simboeck, E., Sawicka, A., Zupkovitz, G., Senese, S., Winter, S., Dequiedt, F., ... Seiser, C. (2010). A phosphorylation switch regulates the transcriptional activation of cell cycle regulator p21 by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 41062–41073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184481>
- Society, A. C. (2013). What is cancer? Retrieved May 12, 2016, from <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>
- Starr, C. G., & Wimley, W. C. (2017). Antimicrobial peptides are degraded by the cytosolic proteases of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(12), 2319–2326. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.008>
- Sunkara, L. T., Jiang, W., & Zhang, G. (2012). Modulation of Antimicrobial Host Defense Peptide Gene Expression by Free Fatty Acids. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049558>
- Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, 8(4), 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
- Tang, C., Li, C., Zhang, S., Hu, Z., Wu, J., Dong, C., ... Zhou, H. B. (2015). Novel Bioactive Hybrid Compound Dual Targeting Estrogen Receptor and Histone Deacetylase for the Treatment of Breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(11), 4550–4572. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00099>
- Valdespino-Gómez, V. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2012). Terapia epigenética en el cáncer. Logros y perspectivas. *Cirugía Y Cirujanos*, 80(5), 470–480.
- van Zoggel, H., Carpentier, G., Dos Santos, C., Hamma-Kourbali, Y., Courty, J., Amiche, M., & Delbé, J. (2012). Antitumor and Angiostatic Activities of the Antimicrobial Peptide Dermaseptin B2. *PLoS ONE*, 7(9), 25–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044351>
- Velázquez-Hernández, E. (2017). *La combinación de y-tionina y butirato de sodio*

induce apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon.

- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 275–283.
- Wade, M. A., Jones, D., Wilson, L., Stockley, J., Coffey, K., Robson, C. N., & Gaughan, L. (2015). The histone demethylase enzyme KDM3A is a key estrogen receptor regulator in breast cancer. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 196–207. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1298>
- Wang, G. G., Allis, C. D., & Chi, P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, part I: covalent histone modifications. *Trends in Molecular Medicine*, 13(9), 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.07.003>
- Winter, E., Chiaradia, L. D., Silva, A. H., Nunes, R. J., Yunes, R. A., & Creczynski-Pasa, T. B. (2014). Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.02.002>
- Xiao, Y. F., Jie, M. M., Li, B. S., Hu, C. J., Xie, R., Tang, B., & Yang, S. M. (2015). Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. *Journal of Immunology Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/761820>
- Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/nrd1930>
- Yu, Y., Deng, Y., Lu, B. M., Liu, Y. X., Li, J., & Bao, J. K. (2014). Green tea catechins: A fresh flavor to anticancer therapy. *Apoptosis*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0908-5>
- Zentner, G. E., & Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), 259–66. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2470>
- Zhang, G., & Pradhan, S. (2014). Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life*, 66(4), 240–256. <https://doi.org/10.1002/iub.1264>
- Zhang, J., & Zhong, Q. (2014). Histone deacetylase inhibitors and cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(20), 3885–3901.

<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1656-6>

Zhao BC, Lin HC, Yang D, Ye X, L. Z. (2015). Disulfide Bridges in Defensins. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(2), 206–219.

Zhou, V. W., Goren, A., & Bernstein, B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews. Genetics*, 12(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrg2905>