



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS**



**“Efecto de ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en el  
crecimiento de células de mamíferos”**

**TESIS**

**Para Obtener el Título de:**

**Maestra en Ciencias en Biología Experimental**

**Presenta:**

**Bióloga. María Dolores Vázquez Rivera**

**Asesor:**

**Doctor en ciencias en biología experimental. Víctor Meza Carmen**

**Co-asesor:**

**Doctor en ciencias en biotecnología. Jesús Campos García**

**Morelia, Mich., Diciembre del 2015.**

ÍNDICE	Página
Índice de figuras	v
Índice de tablas.	viii
Resumen.	ix
Abstract.	x
<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y factores de virulencia.</b>	<b>1</b>
1.2. Quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3. Ciclodipéptidos o 2, 5 dicetopiperazinas	2
1.4. Síntesis de ciclodipéptidos a través de ciclodipéptidos sintasas (CDPS)	3
1.5. Síntesis de ciclodipéptidos por péptido sintasas no ribosomales (NRPS)	4
1.6. Actividades biológicas de los ciclodipéptidos.	6
<b>1.7. Generalidades del cáncer.</b>	<b>8</b>
1.7.1. Cáncer cervicouterino	9
1.7.2. Cáncer colorrectal	9
1.7.3. Cáncer de mama	9
<b>1.8. Generalidades del ciclo celular</b>	<b>10</b>
<b>1.9. Apoptosis: muerte celular programada.</b>	<b>13</b>
1.9.1. Características morfológicas de la apoptosis.	13
1.9.2. Caspasas	14
1.9.3. Vía intrínseca o mediada por mitocondria	14
1.9.4. Vía extrínseca o mediada por receptores	15
<b>1.10. Otros tipos de muerte celular.</b>	<b>17</b>
1.10.1. Necrosis	17

<b>1.10.2.</b> Necroptosis	18
<b>1.10.3.</b> Autofagia celular	19
<b>1.10.4.</b> Piroptosis	20
<b>2. JUSTIFICACIÓN.</b>	21
<b>3. HIPÓTESIS.</b>	21
<b>4. OBJETIVO GENERAL.</b>	21
<b>5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	22
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	23
<b>6.1.</b> Líneas celulares y cultivos primarios	23
<b>6.2.</b> Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	24
<b>6.3.</b> Extracción de la mezcla de CDPs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	24
<b>6.4.</b> Determinación de presencia del Lipopolisacarido en la mezcla de CDPs	25
<b>6.5.</b> Determinación de IL-8 en sobrenadante de células HEK293 por la técnica de ELISA	25
<b>6.6.</b> Ensayo de citotoxicidad por el método colorimétrico de MTT	26
<b>6.7.</b> Determinación de las fases del ciclo celular por la cantidad de ADN mediante Citometría de Flujo	27
<b>6.8.</b> Ensayos de apoptosis y necrosis mediante Anexina V y Yoduro de propidio por Citometría de Flujo	28
<b>6.9.</b> Evaluación de los cambios morfológicos en las líneas celulares cancerosas y no cancerosas por microscopia óptica y de Fluorescencia	29
<b>6.10.</b> Evaluación de la apoptosis mediante Anexina V con inhibidores de caspasas apoptóticas, caspasa 3, caspasas 8 y caspasa 9 por Citometría de Flujo	30
<b>6.11.</b> Determinación del potencial mitocondrial mediante el colorante JC1 en la línea celular cancerosa CaCo-2	32
<b>6.12.</b> Determinación de pro-IL 1 $\beta$ intracelular en la línea celular cancerosa CaCo-2 por Citometría de Flujo	33

6.13. Análisis estadístico de los resultados	34
<b>7. RESULTADOS.</b>	34
7.1. Obtención de la mezcla de CDPs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	34
7.2. Efecto citotóxico de los ciclodipéptidos en líneas celulares cancerosas.	37
7.3. Efecto citotóxico de los ciclodipéptidos en líneas celulares no cancerosas.	40
7.4. Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDPs de <i>P. aeruginosa</i> .	42
7.5. Evaluación de la apoptosis inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	46
7.6. Cambios morfológicos en las líneas celulares cancerosas y no cancerosas inducido por la mezcla de los CDPs de <i>P. aeruginosa</i>	50
7.7. Evaluación de la apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs por citometría de flujo	53
7.8. Participación de las caspasas en la muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs de <i>P. aeruginosa</i> en células CaCo-2	61
7.9. Disminución del potencial de membrana mitocondrial inducido por la mezcla de los CDPs de <i>P. aeruginosa</i> en células CaCo-2.	65
7.10. Efecto de la mezcla de los CDPs de <i>P. aeruginosa</i> sobre los niveles de pro-IL-1 $\beta$ intracelular en la línea celular CaCo-2.	67
<b>8. DISCUSIÓN</b>	70
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	74
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.</b>	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura base de los ciclodipéptidos o 2,5-dicetopiperazinas	3
<b>Figura 2.</b> Síntesis de ciclodipéptidos por ciclodipéptido sintasas (CDPS)	4
<b>Figura 3.</b> Síntesis de ciclodipéptidos a través de la vía de Péptido Sintasas No Ribosomales (NRPS)	5
<b>Figura 4.</b> Esquema de las diferentes fases del ciclo celular G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> ; S; G <sub>2</sub> y M	12
<b>Figura 5.</b> Vías de Inducción de apoptosis	16
<b>Figura 6.</b> Muerte celular por necrosis	17
<b>Figura 7.</b> Esquema de la inhibición de caspasas y su influencia sobre las rutas de señalización de apoptosis intrínseca y extrínseca	31
<b>Figura 8.</b> Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	36
<b>Figura 9.</b> Determinación de lipopolisacarido contaminante en la mezcla de CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i>	36
<b>Figura 10.</b> Efecto citotóxico de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células HeLa y CaCo	38
<b>Figura 11.</b> Efecto citotóxico de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células HeLa y CaCo-2	39
<b>Figura 12.</b> Efecto citotóxico de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células MCF7	40
<b>Figura 13.</b> Efecto de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células NOVA	41
<b>Figura 14.</b> Efecto de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células CEMB	42
<b>Figura 15.</b> Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de <i>P. aeruginosa</i> en la línea celular CaCo-2	43

<b>Figura 16.</b> Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de <i>P. aeruginosa</i> en la línea celular CaCo-2	44
<b>Figura 17.</b> Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de <i>P. aeruginosa</i> en la línea celular HeLa	45
<b>Figura 18.</b> Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de <i>P. aeruginosa</i> en la línea celular HeLa	45
<b>Figura 19.</b> Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células HeLa y CaCo-2	47
<b>Figura 20.</b> Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células HeLa y CaCo-2	48
<b>Figura 21.</b> Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en el cultivo primario de fibroblastos de pulmón de origen humano (NOVA)	49
<b>Figura 22.</b> Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células CaCo-2	50
<b>Figura 23.</b> Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células HeLa	51
<b>Figura 24.</b> Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en fibroblastos de pulmón de origen humano (NOVA)	52
<b>Figura 25.</b> Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células HeLa	53
<b>Figura 26.</b> Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células Caco-2	55
<b>Figura 27.</b> Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células Caco-2	56
<b>Figura 28.</b> Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células HeLa.	57

<b>Figura 29.</b> Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células MCF-7	58
<b>Figura 30.</b> Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células MCF-7	59
<b>Figura 31.</b> Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	60
<b>Figura 32.</b> Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	61
<b>Figura 33.</b> Participación de las caspasas en la muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células CaCo-2	64
<b>Figura 34.</b> Participación de las caspasas en la muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células CaCo-2	65
<b>Figura 35.</b> Disminución del potencial de membrana mitocondrial inducido por la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células CaCo-2	67
<b>Figura 36.</b> Efecto de la mezcla de los CDPs de <i>P. aeruginosa</i> sobre los niveles de pro-IL-1 $\beta$ intracelular en la línea celular CaCo-2	68

---

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Actividades biológicas de diversos ciclodipéptidos.	7
<b>Tabla 2.</b> Inhibidores de caspasas utilizados en los ensayos de apoptosis mediante Anexina V.	31
<b>Tabla 3.</b> Características de excitación y emisión del JC1.	32

## RESUMEN

Las bacterias y sus hospederos eucariotas se comunican entre sí mediante diferentes señales químicas siendo este un mecanismo en el que las moléculas producidas por bacterias afectan positiva o negativamente el desarrollo, el crecimiento y/o la diferenciación de los organismos eucariotas. Los ciclodipéptidos (CDPs) se han descrito como un mecanismo de señalización, dichas moléculas están constituidas por dos aminoácidos ciclados, de la familia de dicetopiperazinas (DKPS).

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que infecta y coloniza huéspedes eucariotas y produce CDPs que participan como metabolitos que interfieren con el quorum bacteriano y como reguladores positivos del crecimiento de plantas. Sin embargo, se desconoce si estos compuestos presentan efectos en el crecimiento de células de mamífero. En este trabajo, se evaluó el efecto de la mezcla de los CDPs constituidos por ciclo (*L*-Pro-*L*-Tyr), ciclo (*L*-Pro-*L*-Val) y ciclo (*L*-Pro-*L*-Phe), aislados de *P. aeruginosa* PAO1 sobre la muerte celular y la proliferación inducida en las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix (HeLa), de colon (CaCo-2) y de mama (MCF-7); así como en células no cancerosas (cultivos primarios). La obtención de los CDPs fue verificada mediante cromatografía de gases acoplada a masas y la ausencia de posibles LPS contaminantes fue verificada mediante un ensayo biológico utilizando células trasfectadas con el receptor TLR4/MD2/CD14. Los CDPs se evaluaron en diferentes líneas celulares, encontrándose que estos presentaron efecto citotóxico en todas las líneas celulares cancerosas. Interesantemente no se encontró efecto citotóxico en las líneas no cancerosas probadas. Los CDPs inhibieron el ciclo celular en las células cancerosas en la fase G0/G1, induciendo en las células CaCo-2 y HeLa una aparente condensación del material genético. Todas las líneas cancerosas probadas presentaron más del 50% de apoptosis temprana a las 6 horas posterior al tratamiento con los CDPs de *P. aeruginosa*. Los resultados indicaron que el mecanismo de acción de los CDPs involucra la vía de apoptosis intrínseca.

Por otro lado, los CDPs reducen en un 32% el potencial mitocondrial en la línea CaCo-2. En conjunto los hallazgos sugieren que los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 inducen apoptosis en células cancerosas mediante un mecanismo dependiente de la vía intrínseca. Adicionalmente se observó una posible activación del inflammasoma.

**Palabras claves:** *Ciclodipéptidos, línea celular, citotóxico, ciclo celular, apoptosis.*

---

## ABSTRACT.

Communication between bacteria and their eukaryotic host cells relies on a wide variety of chemical signals. In this mechanism, molecules produced by bacteria could be positive or negative regulators of cellular development, growth or differentiation. Cyclodipeptides (CDPs) and their derivatives the diketopiperazines (DKPs) have been shown to function as signaling molecules, these compounds are cyclized molecules that comprise two amino acids bound by two peptide bonds.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that infects and colonizes eukaryotic cells and it also produces CDPs that affect the bacterial quorum sensing and positively regulate plant growth. However, it is unknown if these compounds have an effect in human tumor cells. In this work, we assessed the effect of the following CDPs isolated from *P. aeruginosa* PAO1: cyclo (L-Pro-L-Tyr), cyclo (L-Pro- L-Val) and cyclo (L-Pro-L-Phe) in the induced cellular death and proliferation of the cervical adenocarcinoma (HeLa), epithelial colorectal adenocarcinoma (CaCo-2), breast adenocarcinoma (MCF-7) and non-tumor (primary cultures) cell lines. CDPs production was proved by gas chromatography–mass spectrometry and the LPS presence was verified by a biological assay that employed the TLR4/MD2/CD14 receptor transfection of cells. CDPs were evaluated in different cell lines, finding that these showed cytotoxic effect in all cancer cell lines. Interestingly no cytotoxic effect was found in non-cancer lines tested. CDPs inhibited the cell cycle in cancer cells in the G0/G1 phase, it induces in Caco-2 cells and HeLa apparent condensation of the genetic material. All cancer lines tested showed more than 50% of early apoptosis at 6 hours after treatment with the CDPs of *P. aeruginosa*. The results indicate that the mechanism of action involves the CDPs intrinsic apoptosis pathway.

Furthermore, the CDPs reduce by 32% the mitochondrial potential in the Caco-2 line. Taken together, these findings suggest that the *P. aeruginosa* PAO1 CDPs lead to cellular apoptosis via the intrinsic apoptotic pathway. Additionally possible inflammasome activation is observed.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa* y factores de virulencia.

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa con forma de bastón, capaz de crecer en condiciones atmosféricas adversas, se ha encontrado colonizando una gran cantidad de nichos biológicos, por lo que está ampliamente distribuida y se considera ubicua por su capacidad de colonizar suelos, aguas y otros ambientes artificiales (Jayaseelan et al., 2013). Además, es un importante patógeno oportunista para humanos, ya que se encuentra entre las principales causas de infecciones nosocomiales. También es una causa predominante de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística. Estas infecciones son difíciles de erradicar debido a la resistencia natural de la bacteria a los antibióticos comúnmente usados (Stover et al., 2000; Kaatuna y Yagci, 2010).

*P. aeruginosa* presenta diversos factores de virulencia, los cuales tienen un papel importante en la infección de diferentes hospederos. (Abreu et al., 2014). Muchos de los factores de virulencia mejor estudiados de *P. aeruginosa*, incluyen los sistemas de secreción (tipo I, II, III y IV) y efectores asociados a dichos sistemas (incluidos ExoT, ExoU, ExoS, ToxA, fosfolipasa C y proteasa alcalina), y estructuras involucradas en la unión a las células del hospedero como el pili tipo IV. Otros factores de virulencia incluyen aquellos involucrados en la adquisición de hierro (pioquelina y pioverdina), en la síntesis de pequeñas moléculas/toxinas (fenazinas, ácido cianhídrico), alginato, lipopolisacáridos (LPS) y algunos involucrados en el quórum sensing (homoserina lactonas y quinolonas) (Feinbaum et al., 2012).

### 1.2. Quorum sensing en *P. aeruginosa*.

El “quórum sensing” (*quorum*, del latín “de los cuales” se refiere a la proporción o número de individuos necesarios para llegar a un consenso; *sensing*, del inglés “percepción”), es el proceso de comunicación célula a célula en el cual ciertos organismos, como las bacterias usan la producción y posterior detección de señales químicas extracelulares llamadas autoinductores, que encienden redes de señalización que desencadenarán la expresión de genes de una población (Juhas et al., 2005; Ng y Bassler, 2009).

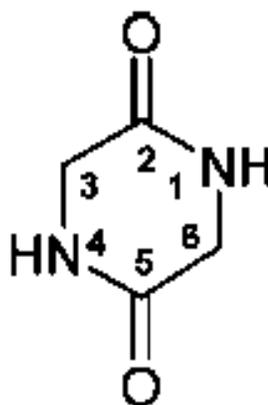
Las bacterias usan la señalización por quórum sensing para regular una variedad de fenotipos, la producción de exopolisacáridos, la producción de factores de virulencia y motilidad, las cuales son esenciales para el establecimiento exitoso de una relación simbiótica o patógena con su respectivo hospedero (González y Keshavan, 2006).

Ortíz-Castro y col. en 2011 encontraron que *P. aeruginosa* PAO1 tiene una actividad promotora del crecimiento vegetal. Esta actividad promotora fue atribuida a los ciclodipéptidos (CDPs), ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), producidos por la bacteria y se observó una respuesta incrementada en las mutantes del quórum sensing *lasI* y en la doble mutante *lasI/rhlI*, sugiriéndose una posible regulación de la producción de los CDPs a través del quórum sensing.

### 1.3. Ciclodipéptidos o 2,5-diketopiperazinas.

Los CDPs y sus derivados, las diketopiperazinas (DKPs o 2,5-DKPs) constituyen una clase de moléculas pequeñas obtenidas por la condensación de dos  $\alpha$ -aminoácidos y sintetizadas por un amplio rango de microorganismos, se ha visto que el 90% de las bacterias Gram negativas los producen (Carvalho et al., 2012). Los CDPs son una clase de estructuras privilegiadas de manera natural, ya que tienen la capacidad de unirse a un amplio rango de receptores, ya que contienen dos enlaces *cis*-amida, dando como resultado dos aceptores

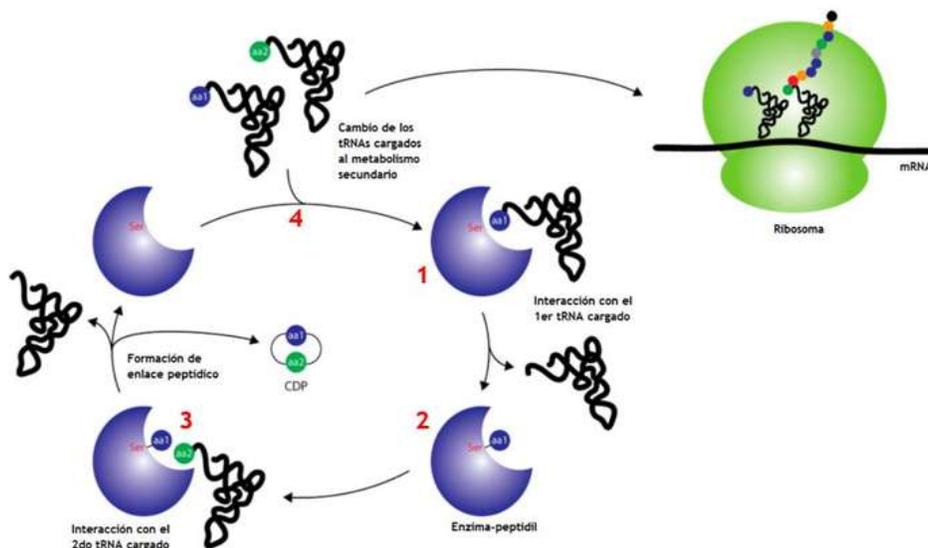
y dos sitios donadores, características importantes para la unión a proteínas, posiblemente enzimas y/o receptores farmacológicos (**Figura 1**) (Borthwick, 2012). Estos CDPs son sintetizados por una familia de enzimas formadoras de enlaces peptídicos dependientes de RNAt llamadas ciclodipéptido sintasas (CDPSs) y también por las NRPS (Péptido Sintasas no Ribosomales) (Belin et al., 2012; Gondry et al., 2009).



**Figura 1.** Estructura base de los ciclodipéptidos o 2,5-diketopiperazinas. Los ciclodipéptidos presentan dos aceptores y dos sitios donadores de puentes de hidrógeno importantes para la unión a enzimas y receptores (Borthwick, 2012).

#### 1.4. Síntesis de ciclodipéptidos a través de ciclodipéptidos sintasas (CDPS).

En un estudio reciente se integró una nueva familia de enzimas formadoras de enlace peptídico a la que llamaron CDPS (ciclodipéptido sintasas) (Belin et al., 2012). Cada CDPS sintetiza preferentemente un ciclodipéptido principal, correspondiente a la introducción preferencial de un aminoácido en el producto, pero estas enzimas son claramente promiscuas produciendo combinaciones de varios CDPs (**Figura 2**). Las CDPS se encuentran en la intersección entre el metabolismo primario y secundario ya que, el uso de RNAt cargados desvía éstas moléculas lejos del metabolismo primario para la síntesis de metabolitos secundarios (Belin et al., 2012).



**Figura 2. Síntesis de ciclodipéptidos por ciclodipéptido sintasas (CDPS).** Se observa **1)** la utilización de aa-RNAt como sustratos para la síntesis de ciclodipéptidos, **2)** La enzima utiliza un mecanismo tipo ping-pong en el cual incorpora un aa-RNAt, toma el aminoácido y el RNAt lo libera e incorpora otro aa-RNAt. **3)** Después de captar el segundo aminoácido libera el segundo aa-RNAt, después lleva a cabo la ciclación del dipéptido. **4)** Cambio de los tRNAs cargados al metabolismo secundario. (Modificado de Belin et al., 2012).

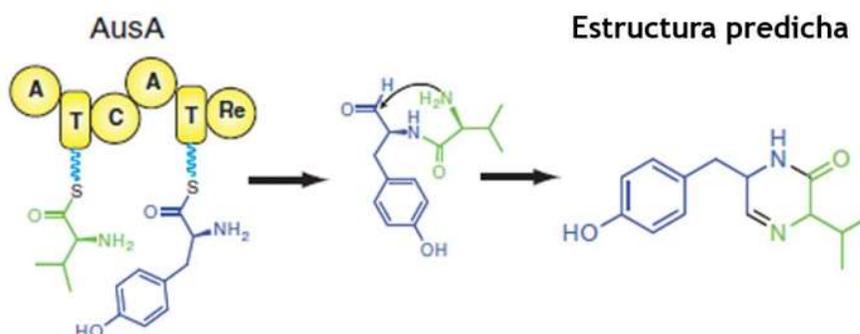
La síntesis de CDPs por CDPS al parecer no son probablemente los productos finales, sino más bien intermediarios en la ruta biosintética de DKPs (Belin et al., 2012).

### 1.5. Síntesis de ciclodipéptidos por Péptido Sintasas No Ribosomales (NRPS).

Las péptido sintasas no ribosomales (NRPS), son enzimas modulares y multifuncionales, en las cuáles cada módulo es la responsable de la incorporación de un aminoácido en el péptido final. Cada módulo consiste de dominios específicos responsables de una etapa particular de la síntesis, los dominios de adenilación seleccionan y activan a un aminoácido libre formando un aminoacil adenilato en un proceso que requiere ATP (**Figura 3**). El aminoácido activado es transferido al dominio que lleva la proteína, el cual es unido

covalentemente por un 4'-fosfopantetenil. Los dominios de condensación son responsables de la formación del enlace peptídico entre sus sustratos aminoacil unidos a sus moléculas adyacentes (Gondry et al., 2009).

Los péptidos no-ribosomales además de estar constituidos por 20 aminoácidos canónicos, contienen estructuras únicas como D-aminoácidos, ácidos grasos, metilaciones, heterociclos, glicosilaciones, fosforilaciones, etc. (Grunewald y Marahiel, 2006; Strieker et al., 2010).



**Figura 3. Síntesis de ciclodipéptidos a través de la vía de Péptido Sintetas No Ribosomales (NRPS).** Se indican los dominios de Adenilación(A), Tiolación (T), Condensación(C) y tioesterasa o Reductasa(Re). Después de la formación del ciclodipéptido la molécula es modificada por enzimas accesorias (Tomada de Morgan et al., 2010).

Los CDPs pueden ser formados por NRPS durante la síntesis de péptidos largos, como productos laterales truncados, por ejemplo: el ciclo (D-Phe-L-Pro) es liberado prematuramente durante la síntesis del decapeptido tirocidina A (Gondry et al., 2009). Además, estas moléculas cuentan con características que los hacen interesantes para el descubrimiento de nuevos fármacos, debido a que los péptidos cíclicos son más biodisponibles y más estables contra la degradación por peptidasas que los péptidos lineales. (Carvalho et al., 2012). Es por esto que actualmente se realizan investigaciones para aprovechar las propiedades de los CDPs en el tratamiento contra el cáncer.

### 1.6. Actividades biológicas de los ciclodipeptidos.

Los CDPs son moléculas que tienen la capacidad de unirse a un amplio rango de receptores y se le han encontrado diversas actividades biológicas como:

Ciclo (L-Phe-L-Pro) y ciclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) actúan como componentes antifúngicos (Ström et al., 2002), el ciclo (L-Phe-L-Pro) de *Lactobacillus plantarum* induce apoptosis en células cancerosas de colon HT-29 (Brauns et al., 2004).

En *Streptomyces fungicidicus* se encontraron cinco diketopiperazinas con propiedades antifouling (fouling del inglés, se refiere a un crecimiento indeseado de organismos sobre las superficies de estructuras marítimas, como plataformas petroleras, barcos, entre otras), dentro de éstos, el ciclo (L-Val-L-Pro) tiene la actividad antifouling más fuerte inhibiendo el crecimiento de *Balanus amphitrite* (Xiancui et al., 2006). Ciclo (L-Phe-L-Pro) ha sido aislado de *P. fluorescens* y *P. alcaligenes* en sobrenadantes libres de células y se ha reportado que están involucradas en mecanismos de percepción de quórum, los cuáles sincronizan respuestas fisiológicas bacterianas de una manera dependiente de la densidad celular, y el hallazgo de que éste mismo ciclodipeptido es producido por *L. plantarum* puede sugerir la posibilidad de un entrecruzamiento entre sistemas de señalización de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Ström K y Sjögren, 2002).

Recientemente, en el 2011 Ortíz-Castro y col. encontraron que *P. aeruginosa* PAO1 tiene una actividad promotora del crecimiento vegetal. Esta actividad promotora fue mostrada por los CDPs: ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Val*) producidos por la bacteria (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Actividades biológicas de diversos ciclodipeptidos.**

CICLODIPEPTIDO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	ESPECIE	REFERENCIA
Ciclo ( <i>L-Pro-L-Tyr</i> ), Ciclo ( <i>L-Pro-L-Val</i> ) y Ciclo ( <i>L-Pro-L-Phe</i> )	Muestran una actividad auxínica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ortiz, et al., 2011
Ciclo ( <i>L-Val-L-Tyr</i> ) Ciclo ( <i>L-Val-L-Phe</i> )	Factor de virulencia bacteriano	<i>Staphylococcus aureus</i>	Morgan, et al., 2010
Ciclo( <i>L-Ile-L-Val</i> ) y Ciclo( <i>L-Phe-L-Pro</i> )	Actividad antifúngica	<i>Propionibacteriu m ssp</i>	Lind, et al., 2007
Ciclo ( <i>L-Phe-L-His</i> )	Inhibidor del ciclo celular en diversas líneas celulares cancerosas.	<i>Aspergillus ustus</i>	Kaneo, et al., 2000

### 1.7. Generalidades del cáncer.

"El cáncer" es un término genérico que se refiere a decenas de enfermedades diferentes que afectan a muchos tejidos y tipos celulares (Hoskin y Ramamoorthy., 2008). Las teorías actuales definen el cáncer como una proliferación celular descontrolada causada por la acumulación progresiva de mutaciones aleatorias en genes críticos que controlan el crecimiento/diferenciación celular (Meng et al., 2012) y en ciertos casos de una reprogramación epigenética (Saito y Suyama, 2015).

Las mutaciones responsables de la formación de tumores cancerosos se agrupan en tres tipos de genes: los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de estabilidad. A diferencia de otras enfermedades de origen genético, como la distrofia muscular que se presenta por la mutación de un gen único, para el desarrollo del cáncer es necesaria la mutación en varios genes (Vogelstein y Kinzler, 2004).

Durante el desarrollo del cáncer se ven alterados diversos procesos fisiológicos de la célula, por ejemplo, la apoptosis, el cual es un mecanismo intrínseco a la maquinaria biológica de las células sanas, sin embargo, durante el desarrollo del cáncer, este mecanismo se puede ver alterado, favoreciendo la progresión tumoral y la resistencia a las terapias antitumorales habituales (Pazo et al., 2012).

Las aberraciones genéticas de las células precursoras tumorales inducen con frecuencia su muerte por apoptosis, sin embargo durante en el proceso de malignización estas células pueden adquirir cambios que conducen a la disfunción en genes y proteínas implicados en las vías apoptóticas, permitiendo a dichas células tumorales evadir la apoptosis (Kerr, 2002).

En México, los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia son: el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer cervicouterino, el cáncer colorrectal y el cáncer de pulmón (GLOBOCAN, 2012).

### **1.7.1. Cáncer cervicouterino.**

El cáncer cervicouterino es el tipo de cáncer que representa la cuarta causa de muerte en mujeres en el mundo (Jemal et al., 2011). En México, en el 2012 se reportaron cerca de 14,000 casos de cáncer cervicouterino, dentro de los cuales se registraron 4,500 muertes (GLOBOCAN, 2012).

Los factores de riesgo principales que se encuentran para desarrollar este tipo de cáncer son la transmisión de virus del papiloma humano de alto riesgo y en general tener un sistema inmunitario incompetente (Ruddon, 2007).

La línea celular modelo es HeLa, la cual proviene de tejido epitelial de cérvix y son positivas para la presencia del virus del papiloma humano, además es ampliamente empleada para probar fármacos contra el cáncer (Jing et al., 2011).

### **1.7.2. Cáncer colorrectal.**

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres y el segundo en mujeres en países desarrollados (Jemal et al., 2011). Su desarrollo se favorece principalmente por las dietas altas en grasas y carbohidratos, proteínas animales y bajas en fibra, añadiéndole la poca actividad física. La línea celular modelo de estudio es la CaCo-2, que consiste en células humanas epiteliales del colon que provocan adenocarcinoma colorrectal, dichas células son empleadas para evaluar la capacidad de fármacos al atravesar la barrera intestinal (Nauliand y Nauli, 2013).

### **1.7.3. Cáncer de mama.**

El cáncer de mama representa el 23% de los nuevos casos de cáncer en el mundo y es el tipo de cáncer diagnosticado con más frecuencia en mujeres (Jemal et al., 2011). En el 2012 en México, 15 de cada 100 fallecimientos por tumores malignos en mujeres de más de 20

años fueron por cáncer de mama, además representa el 19.4 % de los casos de morbilidad hospitalaria (INEGI, 2014).

La línea celular MCF-7 es un modelo de estudio del cáncer de mama ya que son células epiteliales de la glándula mamaria derivadas de un adenocarcinoma humano además se sabe que están involucradas en el desarrollo embrionario y en el desarrollo de la glándula mamaria durante el embarazo (Miller, 2001).

### 1.8. Generalidades del ciclo celular.

El ciclo celular es la secuencia cíclica en la vida de una célula eucariota, que por lo general conserva la capacidad de dividirse, el cual consiste de: Interfase: fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, y las fases de síntesis de DNA (S) y mitosis (M). El ciclo celular tiene lugar en forma ordenada y controlada, lo cual permite realizar el crecimiento y reproducción de acuerdo a las necesidades del organismo. Este ciclo se encuentra dividido en dos grandes etapas: la interfase o preparación de la célula para la división de material genético y la fase M, la división por mitosis (células somáticas) o meiosis (células sexuales) (Cooper y Hausman, 2010).

**Interfase:** Durante esta fase la célula realiza todos los procesos de alistamiento bioquímico y organización celular para que la división pueda dar por resultado 2 o 4 células y este proceso se caracteriza por presentar las siguientes etapas (Cooper y Hausman, 2010).

**Fase G<sub>0</sub>:** Las células que no se replican se encuentran en un G<sub>0</sub>. Estas células pueden ser quiescentes (inactivo) o senescentes (envejecimiento o deterioro). Dichas células generalmente entran a la fase G<sub>0</sub> provenientes de G<sub>1</sub> porque pueden permanecer en reposo (G<sub>0</sub>) por un período indeterminado de tiempo.

**Fase G<sub>1</sub>:** durante esta se incrementa el material enzimático, así como otras estructuras y moléculas. Las células en esta fase pueden sufrir diferentes situaciones según sus capacidades; algunas se quedan fijas, es decir no regresan al ciclo celular; otras se quedan

gran tiempo en G1, hasta que por condiciones especiales regresan al ciclo y son llamadas quiescentes o en fase G0; y las que poseen características proliferativas, después de un tiempo variable continúan el ciclo indefinidamente (**Figura 4**).

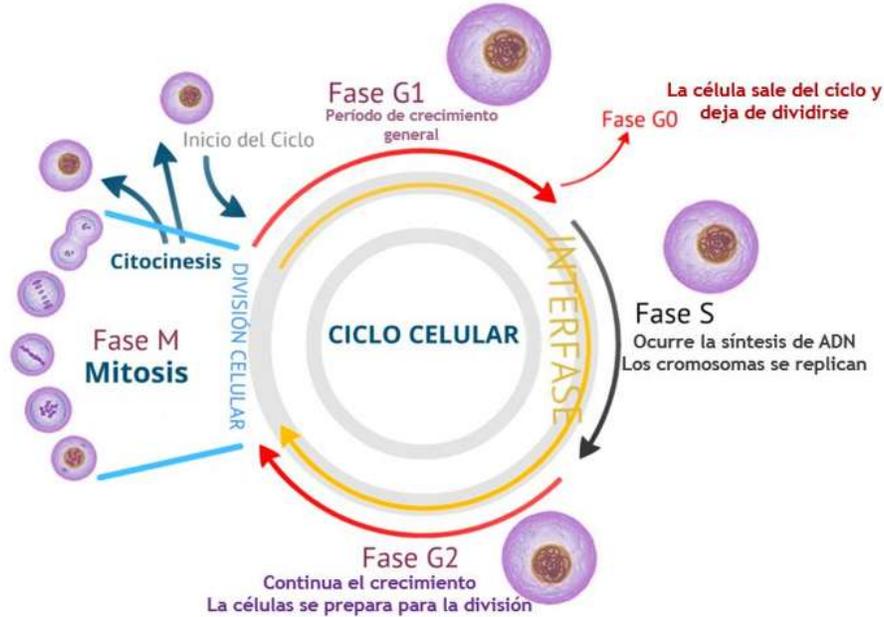
**Fase S (síntesis de DNA):** la célula alcanza el tamaño suficiente, se tienen las proteínas y energía necesaria y se duplica el ADN (**Figura 4**).

**Fase G2:** se prepara para la división, comienza la condensación del ADN para dar forma a los cromosomas, se duplican los centriolos, se ensamblan las estructuras para el citoesqueleto y proteínas que forman parte del huso mitótico (Cooper y Hausman, 2010).

**Mitosis:** este proceso se presenta en las células somáticas, después de pasar por la interfase donde cada célula ha duplicado el ADN para repartirlo de manera idéntica en las células hijas, obteniéndose de esta manera dos células idénticas a la inicial (**Figura 4**).

La progresión del ciclo celular en los organismos eucariotas está regulada por la formación secuencial y la activación e inactivación de un conjunto de moléculas. El ciclo celular lleva un orden y una regulación estricta en cada fase que se efectúa, para lo cual existe un control bioquímico compuesto por proteínas que coordinan los procesos, en este control, también están presentes factores de retraso, los cuales pueden actuar para evitar que alguna fase continúe, si no se ha terminado el anterior (Cooper y Hausman, 2010).

Además, posee unos puntos de control entre el final de una etapa y el comienzo de otra, estos se encuentran entre la fase G1 y S, G2 y M; y en la mitosis entre la metafase y anafase, donde se examina el estado nutricional, crecimiento, estado del ADN, duplicación del material genético, entre otros; este control se basa principalmente en las proteínas cinasas y ciclinas (Núñez y Escalona, 2005).



**Figura 4: Esquema de las diferentes fases del ciclo celular G0/G1; S; G2 y M.** La fase G1 es el período entre el nacimiento de la célula y el comienzo de la replicación del ADN; cuando las células no se dividen quedan en fase G0. La fase S corresponde al periodo de duplicación del genoma, pasando de una dotación 1N a 2N; la fase G2 corresponde al período de preparación para la mitosis (duplicación de centriolos, condensación de cromosomas y ruptura membrana nuclear); la fase M corresponde al momento de la mitosis y el conjunto G1-S-G2 se denomina “interfase”. (Modificado de Nuñez y Escalona, 2005; Audesirk et al., 2005).

Una forma de explicar la génesis del cáncer, es debido a múltiples alteraciones en los genes que controlan la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis (Cooper y Hausman, 2010).

### **1.9. Apoptosis: muerte celular programada.**

El término apoptosis se utilizó por primera vez en 1972 por Kerr y col., para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular. La apoptosis se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, como un mecanismo homeostático para mantener la población celular en los tejidos. También, como un mecanismo de defensa, o cuando las células son dañadas por agentes patógenos o nocivos (Norbury y Hickson, 2001).

Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto a nivel fisiológico como patológico, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células necesariamente mueren en respuesta al mismo estímulo (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002).

#### **1.9.1. Características morfológicas de la apoptosis.**

Las células apoptóticas pueden ser reconocidas por cambios morfológicos estereotípicos: La célula se encoje, muestra deformación y pierde contacto con las células a su alrededor (Elmore, 2007). La cromatina se condensa y se margina a la periferia de la membrana nuclear, se generan también unas estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana, que se denominan blebs. Finalmente la célula es fragmentada en estructuras membranosas compactas y cerradas denominadas “cuerpos apoptóticos” los cuales contienen el citosol, la cromatina condensada y organelos (Lockshin y Zakeri, 2001; Elmore, 2007). Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos y de esta manera son eliminados del tejido, sin causar una respuesta inflamatoria. Estos cambios morfológicos son una consecuencia de las características moleculares y eventos bioquímicos que ocurren dentro de una célula apoptótica, lo más notable es la activación de enzimas proteolíticas las cuales median la ruptura del DNA en fragmentos oligonucleosomales, así como la eliminación de múltiples proteínas que usualmente determinan la integridad y forma del citoplasma y organelos (Elmore, 2007).

### 1.9.2. Caspasas.

El término de caspasa es derivado de “proteasas específicas de aspartato dependiente de cisteína” (Cystein-dependent aspartate-specific proteases); su actividad catalítica depende de un residuo crítico de cisteína dentro del sitio activo altamente conservado, y su acción proteolítica es específica dentro de un residuo de aspartato. Éstas tienen una región N-terminal donde se encuentra su pro dominio seguido de una subunidad grande y otra pequeña, los cuales son a veces separados por un péptido vinculador (Cohen, 1997; Rai et al., 2005).

Se han identificado diez caspasas humanas y han sido categorizadas como iniciadoras (Caspasa 2, 8, 9, 10), las cuales tienen un pro dominio largo. Las caspasas 8 y 10 poseen un dominio de muerte (DED) y un dominio de reclutamiento (CARD). En el caso de las caspasas 9 y 2, estas son reclutadas por este pro dominio para luego ser activadas en complejos por la acción de un ligando en los receptores de muerte en la superficie celular (Elmore, 2007).

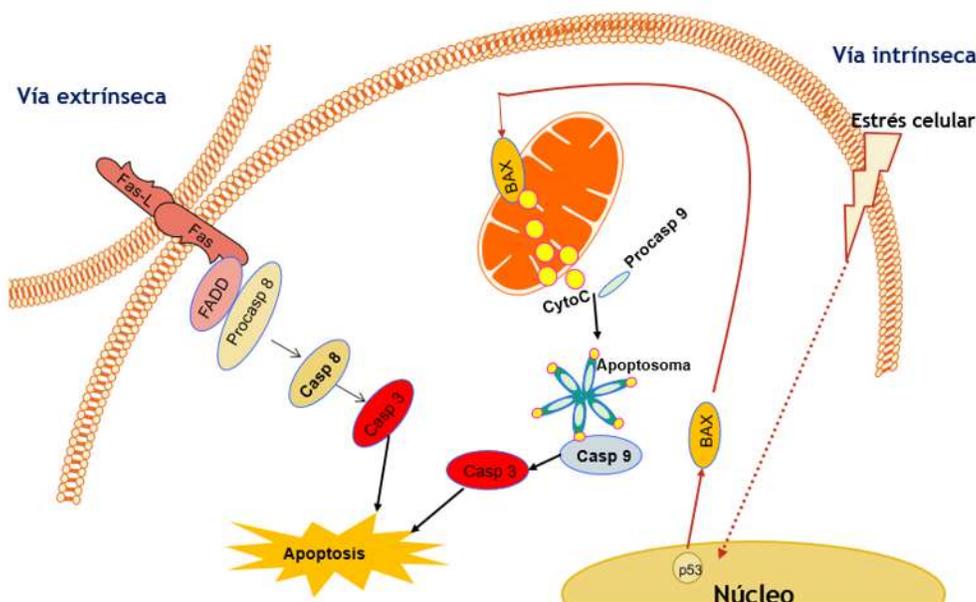
### 1.9.3. Vía intrínseca o mediada por mitocondria.

La ruta intrínseca de inducción de la apoptosis incluye la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 que ejercen su función en la mitocondria por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondria externa. La liberación de diferentes proteínas pro-apoptóticas, que están normalmente presentes en el espacio intermembrana de estos orgánulos, se ha observado durante las etapas iniciales de la apoptosis (Elmore, 2007). La liberación del citocromo c (Cyt c) desde la mitocondria es un paso clave en el inicio del proceso apoptótico. Los mecanismos que regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de las proteínas del espacio intermembranal depende del tipo celular y de la naturaleza del estímulo apoptótico (Gogvadze et al., 2006; Elmore, 2007). Una vez en el citosol, el holocitocromo c (que se forma dentro de la mitocondria) se asocia a la región C-terminal del factor de activación de apoptosis (Apaf-1) que contiene 12-

13 repeticiones de unión proteína-proteína (WD40). Esta interacción facilita la unión de dATP con Apaf-1 y la exposición de su motivo CARD N-terminal, el cual puede ahora oligomerizar y formar una plataforma que activa la procaspasa 9. El resultado de la oligomerización de Apaf-1 es un complejo capaz de reclutar varias moléculas de procaspasa 9 inactivas a través de interacciones heterotípicas para formar el llamado apoptosoma (**Figura 5**). El apoptosoma entonces activa las caspasas iniciadoras (Shi, 2004; Elmore, 2007). La caspasa 9 activa, rompe y activa sucesivamente a la pro-caspasa 3 y 7 que son las responsables de la ruptura de varias proteínas que lideran las características químicas y morfológicas de la apoptosis (**Figura 5**) (Robertson et al., 2000; Elmore, 2007).

#### 1.9.4. Vía extrínseca o mediada por receptores.

La vía extrínseca de inducción de la apoptosis es mediada por la activación de receptores, uno de estos receptores lo constituye Fas (también conocido como CD95 ó APO-1) y su ligando, FasL, el cual se une a Fas en la misma célula o células adyacentes, formando grupos de tres o más moléculas de Fas. A causa de esta agregación, los dominios de muerte intracelular de estos receptores los cuales se encuentran agrupados por Fas, se unen a una proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico denominado FADD (del inglés Fas-associated death domain). FADD se fija a la forma inactiva de la caspasa 8 (procaspasa 8) mediante interacciones homofílicas con su dominio N-terminal efector de muerte (DEDs). Es dentro de este complejo señalizador inductor de muerte (DISC) donde la caspasa 8 es activada (Robertson et al., 2000; Elmore, 2007). La activación total de la enzima sucesivamente promoverá la ruptura de sustratos específicos y de la caspasa 3 efectora. Esto último dará lugar a la ruptura de distintas dianas celulares y a la muerte por apoptosis (Elmore, 2007) (**Figura 5**).



**Figura 5. Vías de inducción de apoptosis.**

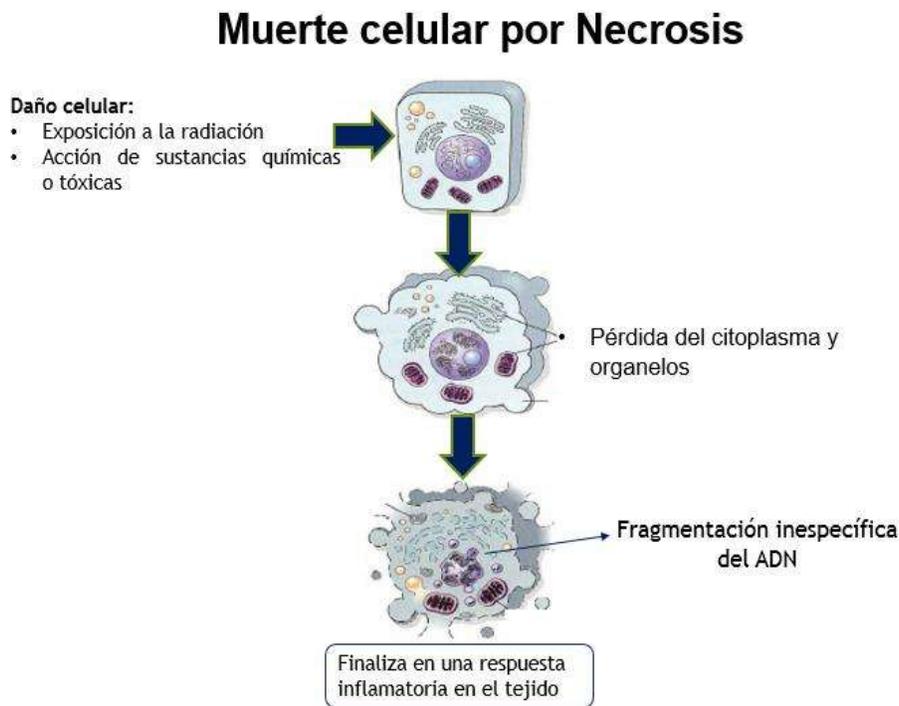
**Vía intrínseca:** Esta vía es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN y es mediada por la mitocondria, en respuesta a estímulos apoptóticos, diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. (Modificado de Rojas et al., 2009).

**Vía extrínseca:** Se puede observar la activación de receptores así como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. Los ligandos de muerte son constitutivamente homotriméricos y la unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo homotrimérico mínimo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y procaspasa 8. (Modificado de Rojas et al., 2009; Elmore, 2007).

**1.10. Otros tipos de muerte celular.**

**1.10.1. Necrosis.**

La necrosis es un tipo de muerte celular en el cual las células sufren un mayor daño, resultando en el hinchamiento, pérdida de la integridad de la membrana plasmática y disrupción de las células. Durante la necrosis, el contenido celular es liberado incontroladamente al ambiente celular provocando un daño a las células circundantes, que finaliza en una respuesta inflamatoria en el tejido (**Figura 6**) (Elmore, 2007).



**Figura 6. Muerte celular por necrosis.** Una muerte necrótica generalmente es el resultado del sometimiento de las células a factores que producen efectos citotóxicos e inevitablemente la pérdida de la función y la muerte. El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o

heterolítica. Los cambios nucleares se deben a la fragmentación inespecífica del ADN. Entre ellos se han descrito: picnosis nuclear o pérdida de volumen, ligera condensación del ADN, aumento de la basofilia nuclear, llamada cariorrexis y cariólisis cuando ya no se detecta estructura cromatínica. (Modificado de Pasparakis y Vandenabeele, 2015; Vandenabeele et al., 2010).

### **1.10.2. Necroptosis**

Es una forma de muerte celular programada regulada genéticamente, sus principales características son similares a la necrosis, se caracteriza por la presencia de inflamación, la disfunción de las mitocondrias, la permeabilización de la membrana plasmática, y la liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular provocando reacciones inflamatorias en el tejido circundante. Esta forma de muerte celular también se asocia con especies reactivas de oxígeno (ROS) de origen mitocondrial y a diferencia de la apoptosis no implica la fragmentación del ADN (Wu et al., 2011).

La necroptosis se desencadena como una forma de inmunidad contra los patógenos, en condiciones deficientes para llevar a cabo la apoptosis, surge esta vía de muerte en la que al igual que en la apoptosis TNF activa TNFR1 quien induce la activación de la proteína de interacción (RIP1) que es una quinasa de serina/treonina que integra la respuesta inflamatoria y necroptótica (Schworer et al., 2014). RIP3 se activa tras la fosforilación por la cinasa de serina/treonina RIP1 (Cho et al., 2009). Se ha observado que la necroptosis es dependiente de RIP3 ya que la actividad de la proteína cinasa RIPK3 determina si las células mueren por apoptosis o necroptosis (Newton et al., 2014). Quizá la necroptosis se caracteriza fundamentalmente por la activación de RIP1 o RIPK3, mientras que la cascada de caspasas sufre una inhibición.

Por otra parte, Liu et al. (2014) han demostrado que la vía Akt y mTOR regulan necroptosis ya que inducen la activación de RIPK1 en la muerte celular neuronal.

### 1.10.3. Autofagia celular.

El término autofagia fué introducido por De Duve y Wattiaux (1966) quienes definieron el proceso de vacuolización para el transporte del material intracelular a los lisosomas para su degradación. La autofagia se deriva del griego "auto" y "fagos" literalmente significa "auto-alimentación"; su función es principalmente reguladora de la homeostasis intracelular, pues los materiales citoplásmicos (proteínas de larga duración y orgánulos dañados) son degradados en los lisosomas y se reciclan para producir nuevos bloques de construcción y para mantener el metabolismo energético (Mizushima y Komatso 2011). Desde un punto de vista morfológico, la autofagia ha sido clasificada como una forma de muerte celular programada asociada con la acumulación masiva de autofagosomas en el citoplasma, la cual frecuentemente, pero no siempre parece ir acompañada de un aumento de flujo autofágico; la autofagia masiva desencadena una muerte parecida a la necrosis e independiente de caspasas (Shimizu et al., 2004; Galluzi et al., 2007). Se ha demostrado que la autofagia participa en procesos naturales tales como el crecimiento, el desarrollo embrionario o el envejecimiento, media la muerte celular que ocurre en el desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Nezis et al., 2010) y también se relaciona a la muerte que ocurre en las células mamarias tras la lactancia y la muerte de algunas células cancerosas que carecen de moduladores apoptóticos tales como Bax y Bak o caspasas (Fazi et al., 2008).

#### **1.10.4. Piroptosis.**

Esta vía de muerte celular es dependiente únicamente de la caspasa 1. Esta caspasa no está involucrada en la muerte celular apoptótica y su función es procesar los precursores de las citocinas inflamatorias (Gurung et al., 2015).

La piroptosis es un proceso que es controlado por el inflamasoma el cual es un complejo de multi-proteínas que median la activación de la caspasa-1, la cual promueve la secreción de las citocinas pro-inflamatorias como son la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18 e IL-33 (Franchi et al., 2015). La caspasa-1 está presente en el citosol de células fagocíticas como un zimógeno inactivo, después de su estimulación por señales endógenas y bacterianas, el zimógeno procaspasa-1 es autoactivado por corte proteolítico hacia un heterodímero enzimáticamente activo.

Los miembros de la familia de las citocinas IL-1 $\beta$  difieren de otras citocinas en que son expresadas como pro-formas biológicamente inactivas en el citosol (Franchi, et al., 2015). La IL-1 $\beta$  está asociada a varias reacciones inmunes, incluyendo el reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de la infección mientras que la IL-18 es importante para la producción de interferón- $\gamma$  y la amplificación de la actividad citolítica de las células asesinas naturales (Franchi et al., 2015; Gurung et al., 2015).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevas moléculas con propiedades anti-proliferativas e inductoras de muerte celular para controlar el crecimiento de células cancerosas es un campo científico de interés. Por lo tanto, conocer los detalles moleculares del efecto de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1, ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) en el control del crecimiento celular permitirá proponer a los CDPs como candidatos potenciales para la terapias contra el cáncer.

## 3. HIPÓTESIS.

La mezcla de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) producidos por *P. aeruginosa* PAO1 inducen muerte celular programada a través de un arresto del ciclo celular dependiente de caspasas.

## 4. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto de la mezcla de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) producidos por *P. aeruginosa* PAO1 sobre la muerte celular programada en líneas celulares cancerosas.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar el efecto citotóxico y en las etapas del ciclo celular de la mezcla de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) producidos por *P. aeruginosa* PAO1 sobre líneas celulares cancerosas y no cancerosas.
2. Caracterizar el mecanismo de muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) producidos por *P. aeruginosa* PAO1 sobre las líneas celulares cancerosas
3. Evaluar la participación de las caspasas de la vía extrínseca (caspasa 8 y 3) e intrínseca (caspasa 9 y 3) de la apoptosis sobre la muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en en la línea celular cancerosa CaCo-2.
4. Evaluar la influencia de la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en el potencial mitocondrial en la línea celular cancerosa CaCo-2.
5. Determinar la participación con la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en los niveles de pro-IL 1 $\beta$  intracelular en la línea celular cancerosa CaCo-2.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Líneas celulares y cultivos primarios.

**Línea celular HeLa** (ATCC® CCL-2™): Células epiteliales humanas aisladas de un adenocarcinoma de cérvix, propagadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. La línea celular fue donada por la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa del CEMB-UMSNH.

**Línea celular CaCo-2** (ATCC® HTB-37™): Células epiteliales humanas aisladas de un adenocarcinoma colorrectal, propagadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. La línea celular fue donada por el Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa del CEMB-UMSNH.

**Línea celular MCF-7** (ATCC® HTB-22™): Células epiteliales humanas aisladas de un adenocarcinoma de glándula mamaria aisladas de un sitio de metástasis (efusión pleural), propagadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. La línea celular fue donada por la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa del CEMB-UMSNH.

**Línea celular HEK-293 TLR4/MD2/CD14**: Células embrionarias humanas de riñón transfectadas de forma estable con los genes humanos que codifican el complejo TLR4/MD2/CD14, bajo el control del promotor de la L-selectina y con resistencia a blasticidina S, como marcador de selección (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Se expandieron con medio DMEM suplementado con 10%, blasticidina S (10 µg/mL), normocina (100 ng/mL) e Hygrogold® (50 ng/mL). La línea celular fue donada por el Dr. Mario Adán Moreno Eutimio del HJM.

**Cultivo primario de CEMB**: Células de epitelio mamario bobino, obtenidas a partir de un cultivo primario de tejido alveolar de ubre de vacas lactantes aplicando la técnica descrita por Anaya-López et al. 2006. propagadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB.

**Cultivo primario NOVA:** Fibroblastos de pulmón humano obtenidas a partir de un cultivo primario de tejido de pulmón. Las células fueron donadas por el Dr. Moisés Selman del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

**PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica obtenidas mediante gradiente de Ficoll de voluntarios sanos. Cultivados en medio DMEM suplementado con 10% de SFB.

### **6.2. Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1.**

Se cultivó *P. aeruginosa* cepa PAO1 en medio Luria-Bertani que contiene 10 g/L de Peptona de caseína (Bioxón de México S.A) 5 g de extracto de levadura (Merck-México S.A) y 5 g/L de NaCl (Sigma Chemical Corporation ) a un pH de 7.0

### **6.3. Extracción de la mezcla de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1.**

Se inocularon 2 mL de medio LB con *P. aeruginosa* cepa PAO1 (pre-inoculo) y se incubó durante 12 H a una temperatura de 37°C en agitación oscilante de 200 rpm. Posteriormente se inoculó 1 L de medio LB con 2 mL. del pre-inoculo y se incubó durante 24 H Una vez transcurrido el tiempo se procedió a centrifugar a 7000 rpm por 10 min. para recuperar el sobrenadante, simultáneamente se tomó 1 mL de sobrenadante para determinar la D.O. a una longitud de  $\lambda=600$  nm. Para la extracción de la mezcla de CDPs, al sobrenadante se le agregó un volumen igual de acetato de etilo con ácido acético 0.01% v/v y se realizaron dos agitaciones vigorosas durante 2 min. Al finalizar se recuperó la fase orgánica y se repitió el procedimiento anterior.

Una vez obtenida la fase orgánica, se procedió a evaporar hasta sequedad (Rotavapor R-215; Buchi) a 60 °C. A la cantidad recuperada se solubilizó con 1 mL de acetato de etilo acidificado. La muestra fue concentrada hasta sequedad en vacío en un Concentrator; LABCONCO. Para verificar la presencia y pureza de los CDPs se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas Agilent GC System 7890A equipado con AgilentMSD 5975C (CG-EM), usando He como gas acarreador a un flujo de 24 mL/min, usando una columna capilar de 30 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m, con un matriz de 5% de

fenil metilsiloxano, con una temperatura de detector de 300°C y de 250°C de inyección. El volumen de la muestra inyectada fue de 1 µl.

#### **6.4. Determinación de presencia del Lipopolisacarido en la mezcla de CDPs.**

Placas de 24 pozos con  $2 \times 10^5$  células HEK 293 transfectadas de forma estable con el gen humano que codifica para el complejo TLR4/MD2/CD14, fueron estimuladas con 1 µg/mL de CDPs como control positivo se utilizó 100 ng de LPS de *E. coli* (SIGMA) y como control negativo únicamente medio de cultivo. Células HEK293 sin transfectar, fueron estimuladas, para garantizar que el efecto evaluado se debe únicamente al TLR transfectado. Las células estimuladas fueron incubadas durante 24 H a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C hasta su determinación de IL-8, como medida indirecta del reconocimiento a través del TLR.

#### **6.5. Determinación de IL-8 en sobrenadante de células HEK293 por la técnica de ELISA**

Se determinó la concentración de IL-8 en los sobrenadantes de los cultivos de células HEK293 transfectadas de forma estable con el gen humano que codifica para TLR4/MD2/CD14, mediante la técnica de ELISA. Se utilizaron los sistemas de OptEIAM (BD Biosciences, San Jose, CA). A cada pozo de una placa de 96 pozos (Corning) se le adicionó 100 µL del anticuerpo de captura (anti-IL-8) diluido 1:250 en solución reguladora de carbonatos con un pH=9.5; se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se realizaron 3 lavados con la solución de lavado (PBS adicionado con 0.1% de Tween 20). Se adicionaron 200 µl de solución reguladora de bloqueo (PBS con 10% de suero fetal bovino), se incubó durante 2 H a temperatura ambiente, finalizado este tiempo se realizaron 3 lavados. Se adicionaron 100 µl de los diferentes sobrenadantes o las diferentes cantidades de estándar

de IL-8 recombinante; la placa se incubó durante 2 H a temperatura ambiente, después de este tiempo se lavaron 5 veces y se añadió 100  $\mu$ l de solución reveladora que contenía anticuerpo de detección biotinilado diluido 1:250 y peroxidasa de rábano acoplada a estreptavidina diluido 1:250. Después de una hora de incubación se realizaron nueve lavados, se añadieron 100  $\mu$ l de solución de orto-fenilendiamina (OPD) con peróxido de hidrógeno disueltos en solución de citratos con un pH=6.5 y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz, finalizado este tiempo se añadieron 15  $\mu$ l de solución de ácido sulfúrico 2 N para detener la reacción enzimática. La absorbancia se determinó a 490 nm en un lector de placas de ELISA (DYNEX, USA). Las concentraciones de IL-8 en los diferentes sobrenadantes se obtuvieron por interpolación de las lecturas correspondientes a la curva estándar.

#### **6.6. Ensayo de citotoxicidad por el método colorimétrico de MTT.**

Las líneas celulares y cultivos primarios fueron expandidas con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone SFB), 100 U/mL de penicilina-estreptomina, 40  $\mu$ g/mL de gentamicina (Pharma Life) y 1  $\mu$ g/mL de anfotericina B (Invitrogen) conocido como medio completo (CM) en cajas de cultivo celular de 60X15 cm (Costar-Corning) y fueron incubadas en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C.

Para determinar la citotoxicidad por el método colorimétrico de MTT thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich Co), las líneas celulares cancerosas HeLa (cáncer cervicouterino) y CaCo-2 (cáncer de colon) y los cultivos primarios NOVA (Fibroblastos de pulmón humano) y CEMB (células de epitelio mamario bovino), fueron sembrados  $3 \times 10^4$  células por pozo en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen de 200  $\mu$ l de medio completo (CM). Las células fueron sincronizadas con medio incompleto, desprovisto de SFB (SS) durante 12 H a 37 °C. Posteriormente a las células se les cambió el medio y se estimularon con diferentes concentraciones de la mezcla de los CDPs (0.001, 0.01, 0.1, 1,

10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs y como control positivo Actinomicina D (5 mM) durante 24 H a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmosfera de  $\text{CO}_2$  al 5%.

Posteriormente se añadió 10  $\mu\text{l}$  de MTT (5 mg/mL) en cada pozo y se incubó durante 4 H a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se adicionó 100  $\mu\text{l}$  de 2-propanol-HCl 1 M (19:1 v/v) para disolver los cristales de formazán y se precedió a las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro de placas (Lector de microplacas Imark, BIO RAD, Hercules, CA, EE.UU).

#### **6.7. Determinación de las fases del ciclo celular por la cantidad de ADN mediante Citometría de Flujo.**

Se sembraron  $3 \times 10^4$  células por pozo de las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2 en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de MC y se incubaran a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmosfera de  $\text{CO}_2$  al 5% durante 12 H. Previamente las células fueron sincronizadas durante 12 H a  $37^{\circ}\text{C}$  con medio-SS. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de mezcla de los CDPs (0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y como control negativo se utilizó únicamente medio SS y como control positivo se utilizó MC. Después de 18 H de tratamiento con los CDPs, las células fueron despegadas por tripsinización. El paquete celular se resuspendió en 1000  $\mu\text{l}$  de etanol frio y se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 H, para permeabilizar la membrana. Posteriormente la muestra fue centrifugada y lavada con PBS 1X para rehidratar la muestra. Finalmente se adiciono 1  $\mu\text{l}$  de 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (Becton Dickinson Biosciences) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo la muestra fue adquirida en el citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) con el programa CFlow Plus y analizada con el programa FlowJo versión 12.1.

### 6.8. Ensayos de apoptosis y necrosis mediante Anexina V y Yoduro de propidio por Citometría de Flujo.

Se sembraron  $3 \times 10^4$  células de las líneas HeLa, CaCo-2 y MCF-7, así como del cultivo primario NOVA, en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen de 200  $\mu$ l de MC. Las células fueron sincronizadas durante 12 H a 37°C con medio-SS previamente. Se estimularon con diferentes concentraciones de la mezcla de los CDPs (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu$ g/mL), como control negativo se utilizó DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs y como control positivo Actinomicina D (5 mM).

Después de 2, 6, 18 y 24 H. posteriores a la estimulación, las células fueron tripsinizadas con tripsin/EDTA 1X y se centrifugaron a 600  $\times$  g durante 5min a 4°C. El paquete celular fue lavado con PBS 1X frio y se resuspendió en 300  $\mu$ l de buffer para anexina V (BD, California EU) durante 15 min a 4°C. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 600 g durante 5min a 4°C y resuspendidas en 50  $\mu$ l de buffer de Anexina V, se adicionó un 1  $\mu$ l de Anexina V conjugada con FitC y 1  $\mu$ l de Ioduro de propidio (PI) (Dead Cell Apoptosis kit; Molecular ondas, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU). La suspensión celular se incubó durante 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, se adicionó 300  $\mu$ l de buffer para Anexina V y se adquirieron 10 000 eventos en el citometro de flujo C6 Accury (BD, California, EU) y se analizó la emisión de fluorescencia a 495/519 nm y 535 / 617nm en el canal FL1 y FL2 respectivamente en el programa Flowjo V12.1 (Tree stat, EU).

### **6.9. Evaluación de los cambios morfológicos en las líneas celulares cancerosas y no cancerosas por microscopía óptica y de Fluorescencia.**

Se sembraron  $1 \times 10^4$  células por pozo en 1 mL de CM de las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2, así como el cultivo primario NOVA en placas de 12 pozos de fondo plano, con cubreobjetos tratados con colagena previamente. Las células fueron sincronizadas con medio-SS durante 12 H a 37°C y se incubaron con diferentes concentraciones de la mezcla de los CDPs (0.1, 1, 10, y 100 ug/mL), se utilizó como control DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs y como control positivo Actinomicina D (5 mM).

Después de 24 H de tratamiento con los CDPs, las células se lavaron con PBS 1X, para posteriormente ser fijadas con paraformaldehído (PFA al 4%) durante 10 min a 4°C. Únicamente se tiñeron con DAPI (dilución 1: 1000) las células HeLa durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con PBS, y se retiraron los cubreobjetos, para ser colocado de forma invertida en un portaobjetos con PBS y glicerol (relación 1:1). Las células fueron observadas con un microscopio invertido de contraste de fases (Carl Zeiss-HB0-50, San Diego, CA, EE.UU.) con una cámara digital AxioCam/Cc1. Las tinciones de células HeLa se observaron con un microscopio confocal (Olympus FV1000, Center Valley, PA, EE.UU.).

### **6.10. Evaluación de la apoptosis mediante Anexina V con inhibidores de caspasas apoptóticas, caspasa 3, caspasas 8 y caspasa 9 por Citometría de Flujo.**

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células de la línea cancerosa CaCo-2 en placas de 24 pozos de fondo plano en un volumen de 0.5 mL de MC. Las células fueron sincronizadas durante 12 H a 37°C con medio-SS previamente. Las células fueron tratadas con los inhibidores de caspasas apoptoticas: Z-VAD-FMK, Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK y Z-LEITD-FMK a una concentración de 10 mM y fueron incubadas durante 15 min a 37°C (**Tabla 2**), (**Figura 7**). Posteriormente fueron estimuladas con 10 ug/mL de la mezcla de CDPs durante 6 H; como controles negativos: se utilizó DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs y la ausencia de los inhibidores de caspasas. Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron tripsinizadas y se recuperó el paquete celular por centrifugación a  $600 \times g$  durante 5 min a 4°C. El paquete celular fue lavado con PBS 1X frio y resuspendido en 300 µl de buffer para Anexina V (BD, California EU) durante 15 min a 4°C. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 600 g durante 5 min a 4°C y resuspendidas en 50 µl de buffer de Anexina V, se adicionó un 1 µl de Anexina V conjugada con Alociocianina (APC) (BD Pharmigen, San José California, EU). La suspensión celular se incubó durante 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, se adicionó 300 µl de buffer para Anexina V y se adquirieron 10 000 eventos en el citometro de flujo C6 Accury (BD, California, EU) y se analizó la emisión de fluorescencia a 650/660 nm en el canal FL4 en el programa Flowjo V12.1 (Tree stat, EU).

Tabla 2. Inhibidores de caspasas utilizados en los ensayos de apoptosis.

Inhibidor	Nombre del inhibidor	Efecto	Concentración	Casa comercial
Inhibidor general de caspasas	Z-VAD-FMK	Caspasa 1, 3, 8 y 9	10 mM	BD Pharmingen
Inhibidor de caspasa 3	Z-DEVD-FMK	Caspasa 3	10 mM	BD Pharmingen
Inhibidor de caspasa 8	Z-IETD-FMK	Caspasa 8	10 mM	BD Pharmingen
Inhibidor de caspasa 9	Z-LEITD-FMK	Caspasa 9	10 mM	BD Pharmingen

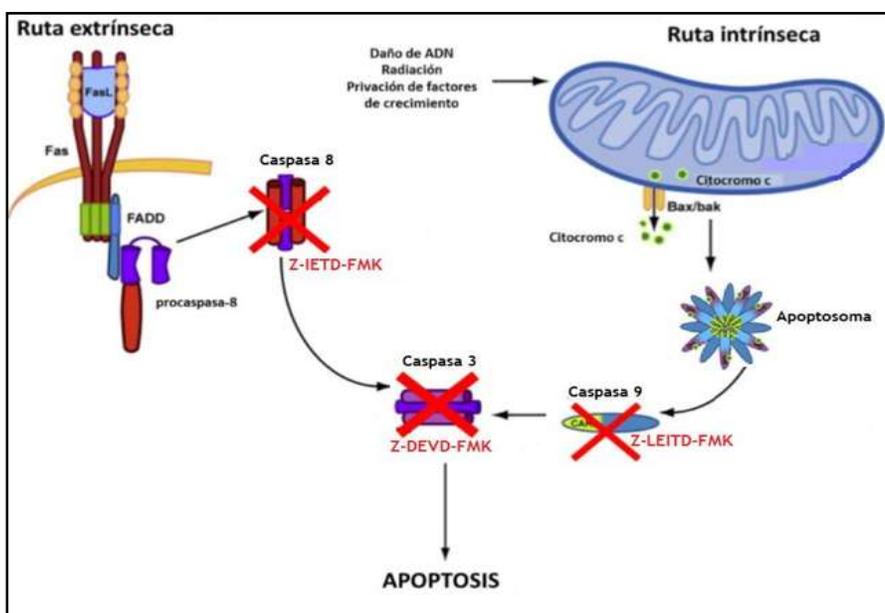


Figura 7. Esquema de la inhibición de caspasas y su influencia sobre las rutas de señalización de apoptosis intrínseca y extrínseca. En rojo aparecen los inhibidores de caspasas: Z-DEVD-FMK que actúa sobre caspasa 3 bloqueando las dos rutas; Z-IETD-FMK

que actúa sobre la caspasa 8 inhibiendo la vía extrínseca y Z-LEITD-FMK que actúa sobre la caspasa 9 bloqueando la vía intrínseca de la apoptosis.

**6.11. Determinación del potencial mitocondrial mediante el colorante JC1 en la línea celular cancerosa CaCo-2.**

Para el análisis del potencial mitocondrial se utilizó el kit BD MitoScreen (BD Pharmingen, EU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células de la línea cancerosa CaCo-2 en placas de 24 pozos de fondo plano (Corning) en un volumen de 0.5 mL de CM. Las células fueron estimuladas durante 6 H con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la mezcla de los CDPs, como control negativo se utilizó DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs. Posterior a la estimulación, las células fueron tripsinizadas con Tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco) y se centrifugaron a 600 xg durante 5 min a 4°C. El paquete celular fue lavado con PBS 1X frío. Posteriormente, se resuspendió en 125  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo JC1 (JC-1 Working Solution, BD Pharmingen, EU), las células fueron incubadas durante 15 min a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación se les agregó 500  $\mu\text{l}$  de solución de ensayo (1X Assay Buffer JC-1, BD Pharmingen, EU) y se centrifugó a 600 x g durante 5 min a 4°C. Posteriormente el paquete celular fue lavado con 500  $\mu\text{l}$  de solución de ensayo. Finalmente, se adicionó 300  $\mu\text{l}$  de solución de ensayo para realizar la adquisición en el citómetro de flujo C6 Accury (BD, California, EU) y se analizó la fluorescencia emitida del 5,5',6,6' tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol carbocianin ioduro(JC1) en el canal FL1 y FL2. (Tabla 3). El análisis del potencial mitocondrial fue realizado en el programa de análisis de datos Flowjo V12.1 (Flowjo LSS, EU)

**Tabla 3. Características de excitación y emisión del JC1.**

	<b>JC1</b>	
	<b><math>\gamma</math> excitación (nm)</b>	<b><math>\gamma</math> emisión (nm)</b>
Monómeros	485	530
Agregados	535	490

### **6.12. Determinación de pro-IL 1 $\beta$ intracelular en la línea celular cancerosa CaCo-2 por Citometría de Flujo.**

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células de la línea cancerosa CaCo-2 en placas de 24 pozos de fondo plano (Corning) en un volumen de 500  $\mu$ l de MC y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%. Previamente las células fueron sincronizadas durante 12H a 37°C con medio-SS. Las células fueron estimuladas 10  $\mu$ g/mL de la mezcla de los CDPs, como control negativo se utilizó únicamente DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs. Después de 6H de tratamiento con los CDPs, las células fueron tripsinizadas con Tripsina-EDTA al 0.05 % (Gibco). El paquete celular se resuspendió en 250  $\mu$ l de solución de permeabilización (BD Cytotfix/Cytoperm. Pharmigen, San José California, EU) y se incubó durante 20 min a una temperatura de 4°C protegidas de la luz y transcurrido el tiempo se adicionó 250  $\mu$ l de buffer de lavado 1X (BD Perm Wash Pharmigen, San José California, EU). Posteriormente las células fueron centrifugadas a 600 x g durante 5min a 4°C, resuspendidas en 50  $\mu$ l de buffer de lavado 1X y se adicionó un 1  $\mu$ l del anticuerpo Anti-proIL-1 $\beta$  conjugada con Alexa Fluor 647 (Life Technologies, Carlsbad, California, EU). La suspensión celular se incubó durante 20 min a 4°C protegido de la luz. Finalmente, se adicionó 300  $\mu$ l de buffer de lavado para la adquisición en el citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) con el programa CFlow Plus. Se analizó la intensidad media de fluorescencia en el canal FL4 a 633/635 nm en el programa Flowjo V12.1 (Flowjo LSS, EU).

### 6.13. Análisis estadístico de los resultados.

El análisis de las variables cuantitativas se muestra mediante promedios y desviaciones estándar.

Las diferencias entre los porcentajes de viabilidad y apoptosis entre las diferentes condiciones fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post hoc de Tukey.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. Obtención de la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1.

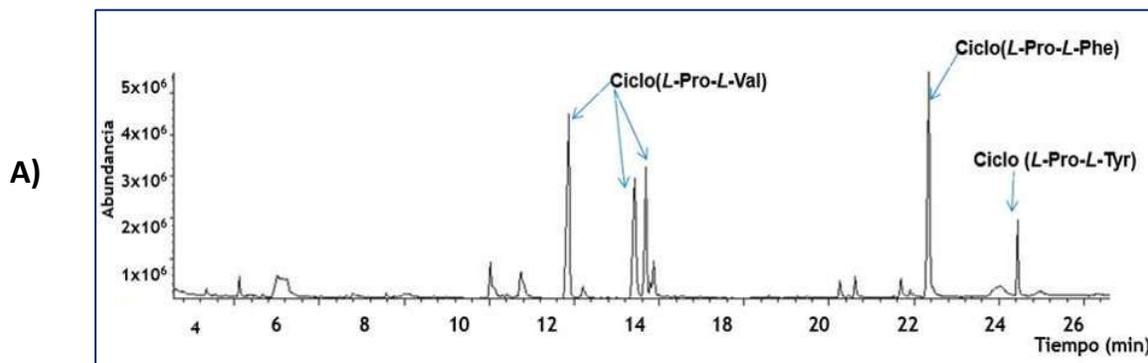
Se realizó la obtención de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 a partir de 1 L de sobrenadante de un cultivo de *P. aeruginosa* en fase de crecimiento logarítmica mediante una extracción líquido-líquido con acetato de etilo acidificado. La fase orgánica se concentró hasta obtener un extracto seco, el cual fue solubilizado en DMSO (0.1%) para tener una concentración de 20 mg/mL.

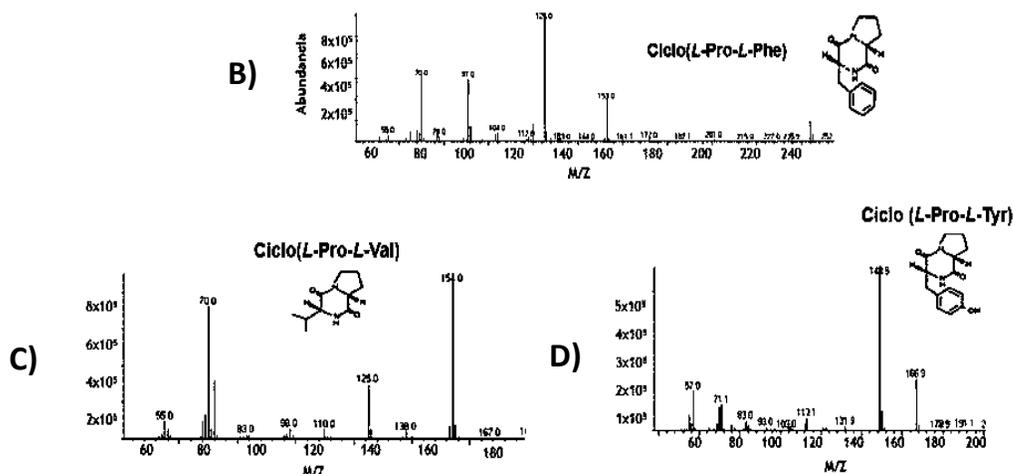
La mezcla de CDPs fué analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). En la **Figura 8** se muestra el cromatograma representativo, en el cual se observan los picos cromatográficos y los tiempos de retención cuyo patrón de fragmentación molecular corresponde a los tres CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) producidos por *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 8 B, C y D**).

Para el ciclodipéptido ciclo (*L-Pro-L-Val*) se obtuvieron tres picos cromatográficos cuyos tiempos de retención fueron 11.2, 12.7 y 13.0 min, se sugiere que este comportamiento es porque, quizás está sufriendo modificaciones sobre la molécula de ciclo (*L-Pro-L-Val*) ya que

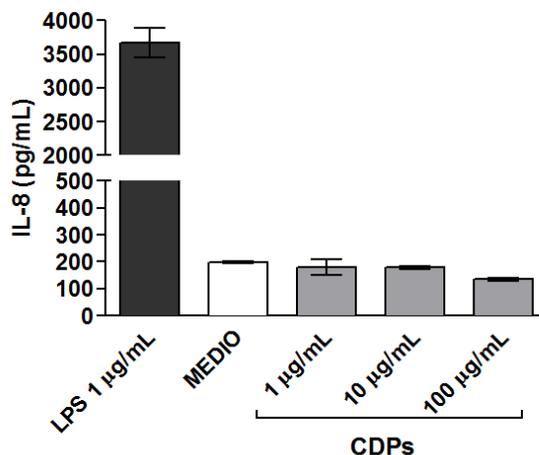
el patrón de ionización indica que corresponden a dicho CDPs (**Figura 8A**). En los tiempos de retención de 19.8 y 21.8 min se identificó dos picos cromatográficos que corresponden a ciclo (*L*-Pro-*L*-Phe) y ciclo (*L*-Pro-*L*-Tyr), respectivamente, (**Figura 8-A**).

Debido a que el método de obtención de los CDPs proviene de una extracción de un cultivo de *P. aeruginosa*, podía existir la posibilidad de contaminación con endotoxina, lipopolisacárido (LPS), la cual es una molécula que presenta diversas actividades biológicas como la inducción de muerte celular programada en células eucariotas. Por tal motivo se analizó la presencia de endotoxina en la mezcla de CDPs de forma indirecta mediante un ensayo biológico, ya que estos métodos permiten detectar hasta picogramos de endotoxina. El ensayo consistió en estimular con diferentes concentraciones de la mezcla de CDPs, células HEK transfectadas con los genes TLR4/MD2/CD14, que es el complejo receptor del LPS. Como medida indirecta de la señalización del receptor transfectado se analizó la liberación de IL-8. No se detectaron niveles de IL-8 con las concentraciones de CDPs analizadas, lo cual nos indica que la mezcla de CDPs no presenta trazas de LPS contaminante. (**Figura 9**).





**Figura 8. Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).** **A)** Cromatograma representativo del extracto que contiene la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1, se indican los tiempos de retención de los ciclodipéptidos encontrados. **B)** Patrón de fragmentación de Cyclo (*L-Pro-L-Phe*). **C)** Patrón de fragmentación de Cyclo (*L-Pro-L-Val*). **D)** Patrón de fragmentación de Cyclo (*L-Pro-L-Tyr*).



**Figura 9. Determinación de Lipopolisacrido contaminante en la mezcla de CDPs producidos por *P. aeruginosa*.** Células HEK 243 transfectadas de forma estable con los genes humanos que codifican para TLR4/MD2/CD14 fueron estimuladas con 1, 10 y 100

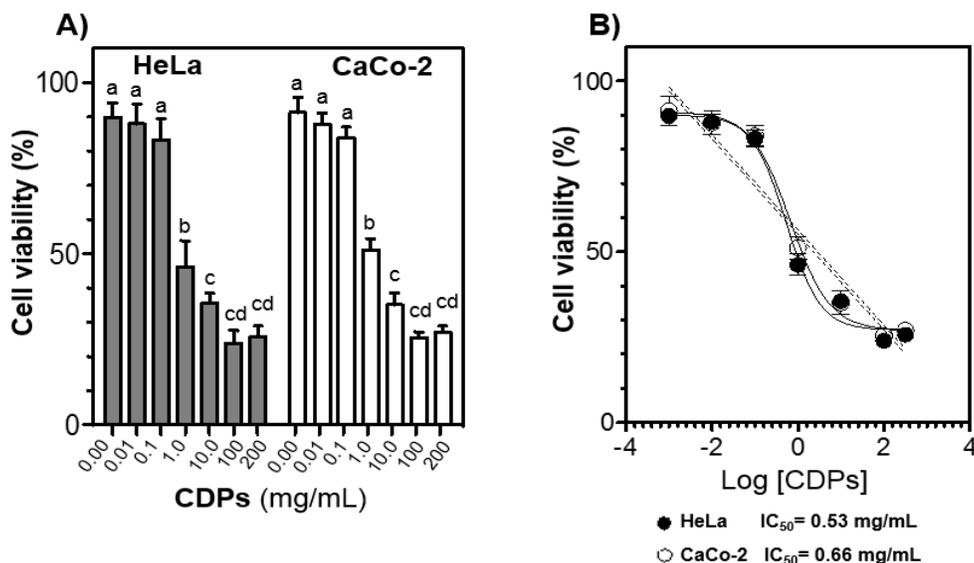
µg/mL de CDPs, como controles negativos se estimuló con medio y como control positivo se estimuló con 100 ng/mL de LPS de *E. coli*. Después de 24 H post-estimulación se analizó la presencia de IL-8 en el sobrenadante, como medida del reconocimiento a través del receptor transfectado. Los resultados se encuentran expresados como el promedio  $\pm$ SD de tres repeticiones. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Una vez obtenida y confirmada la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1, se procedió a realizar los ensayos de viabilidad así como de muerte celular inducida por los CDPs en diferentes líneas celulares cancerosas y células no cancerosas de cultivos primarios.

### **7.2. Efecto citotóxico de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en líneas celulares cancerosas.**

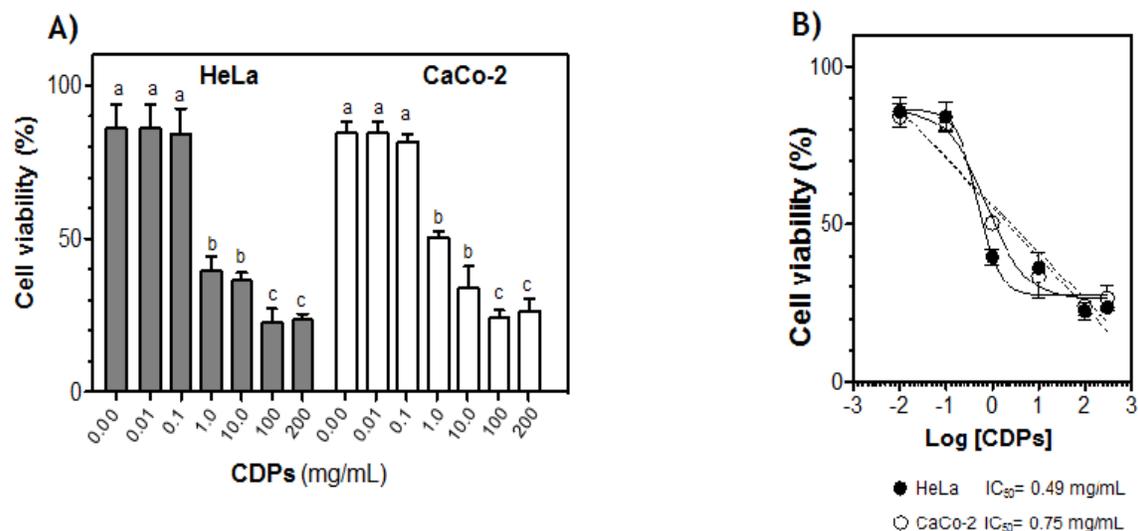
Con la finalidad de evaluar el efecto citotóxico de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 en células cancerosas, se utilizaron las líneas celulares HeLa, Caco-2 y MCF-7 como modelos de estudio. Se estimuló con diferentes concentraciones de la mezcla de los CDPs en los cultivos celulares y los resultados obtenidos mostraron que dicha mezcla causó una disminución en la viabilidad celular de forma dosis dependiente a las concentraciones de 1, 10, 100 y 200 mg/mL después de 24 H de estimulación, dicho efecto se observó tanto en las células crecidas en medio completo (**Figura 10**), como en medio incompleto (**Figura 11**).

La viabilidad de las células fue afectada por la mezcla de los CDPs, particularmente con 10 y 100 mg/mL de los CDPs, ya que se mostró una disminución en la viabilidad celular hasta de un 65% y 75%, respectivamente (**Figura. 10-A**). La concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de la mezcla de los CDPs, fue de 0.53 y 0.63 mg/mL para las células HeLa y CaCo-2, respectivamente (**Figura. 10-B**).



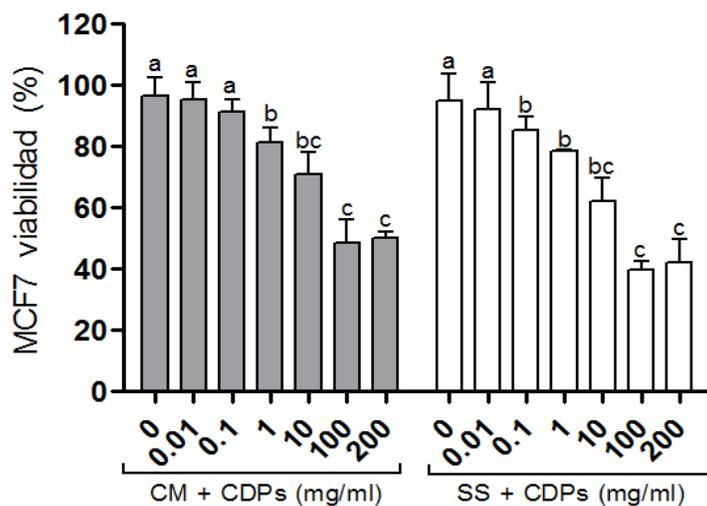
**Figura 10. Efecto citotóxico de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo.** Las células fueron crecidas en medio completo con la mezcla de los CDPs durante 24 H. **(A)** La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Las barras corresponden al error estándar. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO 0.1%) ( $p < 0.05$ ) se muestran en letras. **(B)** Análisis de regresión no lineal para la inhibición de la viabilidad celular causada por la mezcla de los CDPs. Intervalo de confianza de 95% ( $p < 0.001$ ). Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) HeLa: 0.53 mg/mL, CaCo-2: 0.66 mg/mL.

Las células tratadas con los CDPs en medio incompleto mostraron ligeras diferencias con respecto a las células en medio completo, sin embargo dichas diferencias no fueron significativas **(Figura. 11 A y B)**.



**Figura 11. Efecto citotóxico de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2.** Las células fueron incubadas en medio incompleto con la mezcla de los CDPs durante 24 h. **(A)** La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se muestran en letras. **(B)** Análisis de regresión no lineal para la inhibición de la viabilidad celular causada por la mezcla de los CDPs. Intervalo de confianza de 95% ( $p < 0.001$ ).

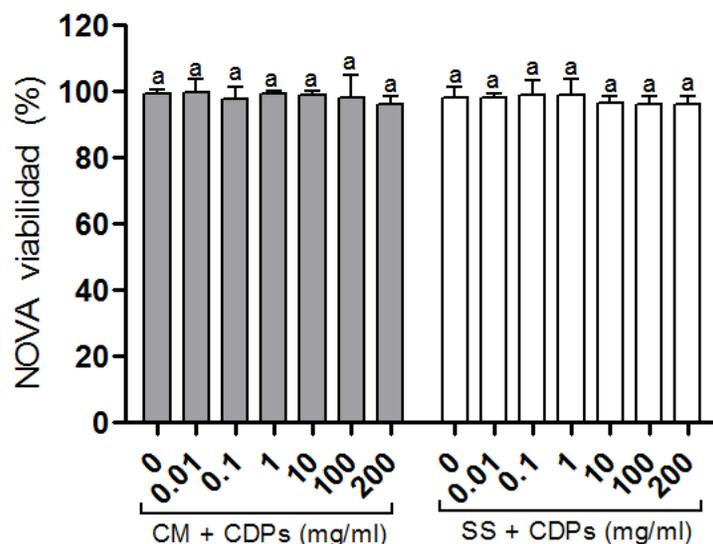
Las células MCF7 mama mostraron un efecto en la viabilidad celular, particularmente cuando fueron crecidas en medio-SS, con una concentración de 10 y 100 mg/mL de la mezcla de CDPs, mostrando una disminución de su viabilidad de 33.5% y 61%, respectivamente (**Figura 12**)



**Figura 12. Efecto citotóxico de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células MCF7.** Las células fueron crecidas en medio completo (CM) y medio incompleto (SS) con la mezcla de los CDPs durante 24 H. La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se muestran en letras.

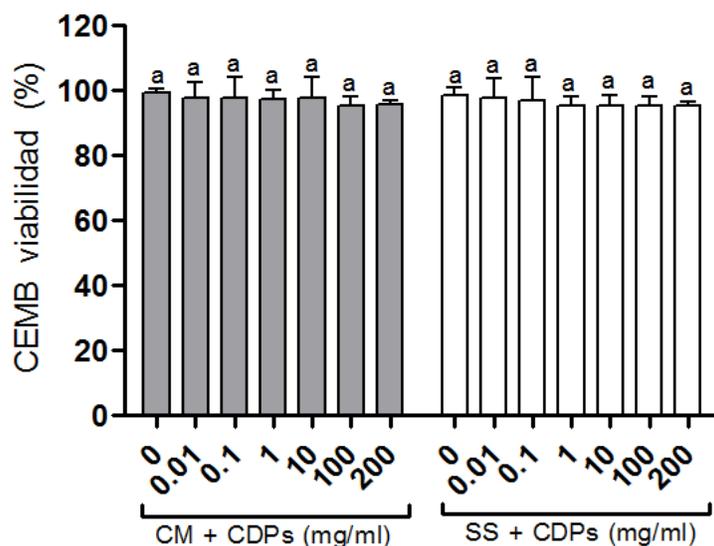
### 7.3. Efecto citotóxico de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en líneas celulares no cancerosas.

Las CEMB y NOVA fueron seleccionadas para evaluar el efecto de los CDPs en un modelo de células no cancerosas, y probar si existe un efecto diferencial entre células cancerosas y no cancerosas. Nuestros resultados mostraron una viabilidad del 100% en todas las condiciones evaluadas (**Figura. 13 y 14**), En este trabajo se compararon tres líneas celulares cancerosas y dos tipos de células no cancerosas, sin embargo, se debe tener en cuenta que estas células también se diferencian en la especie y tipo de tejido de origen. Por lo tanto, es necesario más trabajo con otros tipos celulares tanto cancerosos como no cancerosos.



**Figura 13. Efecto de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células NOVA.** Las células fueron incubadas en medio completo e incompleto con la mezcla de los CDPs durante 24 H. La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se muestran en letras.

Es importante mencionar que los cultivos primarios utilizados en este trabajo (NOVA y CEMB) fueron tratados durante 48 y 72 H con la mezcla de los CDPs, sin embargo no se mostraron diferencias significativas en los diferentes tiempos de estimulación, por lo cual se muestran únicamente los datos correspondientes a 24 H (**Figura 13 y 14**), lo cual es comparativo con los ensayos en las líneas celulares cancerosas.

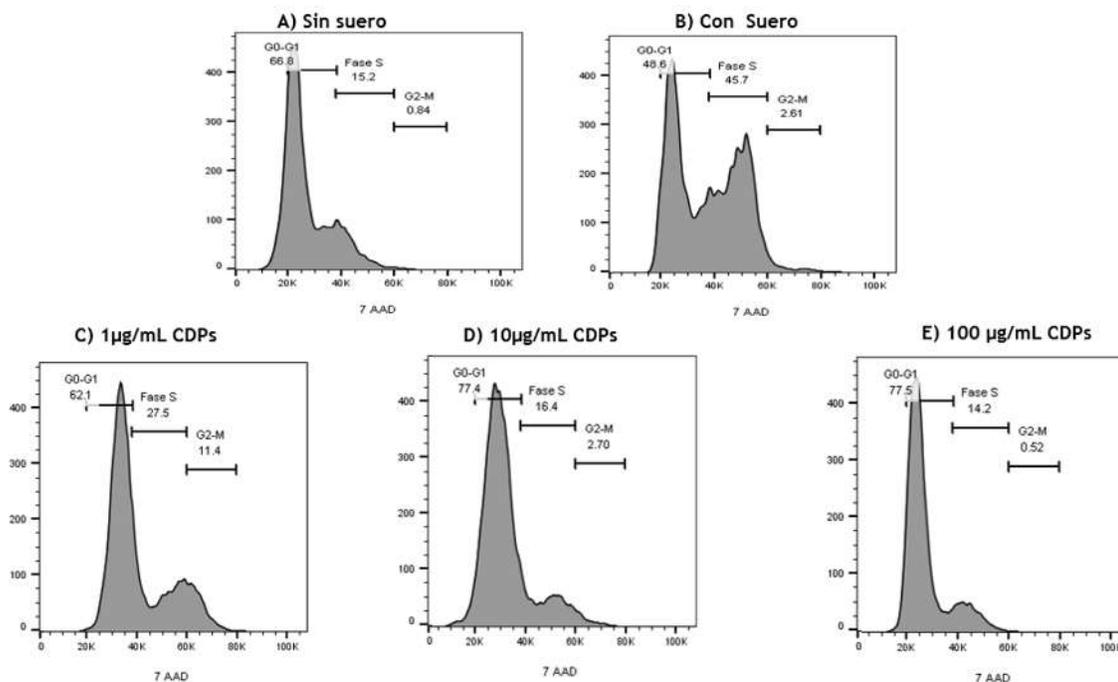


**Figura 14. Efecto de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células CEMB.** Las células fueron incubadas en medio completo e incompleto con la mezcla de los CDPs durante 24 H. La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se muestran en letras.

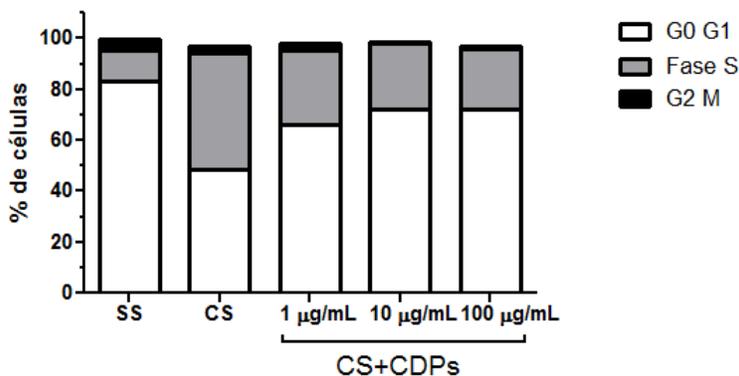
#### 7.4. Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa*.

Para evaluar el efecto de los CDPs sobre la proliferación de células cancerosas (CaCo-2 y HELA) se determinó el porcentaje de células que se encontraban en las diferentes fases del ciclo celular (G0/G1, síntesis y G2/M) mediante la cantidad de ADN por Citometría de Flujo (**Figura 15**). El porcentaje de células CaCo-2 en la fase G0/G1 aumentó en un 27% y 59% con 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de la mezcla de CDPs, respectivamente respecto a las células sin tratamiento (únicamente con suero). El porcentaje de células CaCo-2 en la fase de síntesis del material genético disminuyó en un 40% y 64% con 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente de la mezcla de CDPs con respecto a las células sin tratamiento. El porcentaje de células CaCo-2 en la fase G2/M disminuyó en un 80% con 100  $\mu\text{g/mL}$  de la mezcla de CDPs con respecto a las células

sin tratamiento. La **Figura 15**, muestra el perfil del ciclo celular para la línea celular CaCo-2 en presencia de los CDPs, indicándose los porcentajes de células distribuidas cada una de las fases del ciclo celular, después del tratamiento con los CDPs.

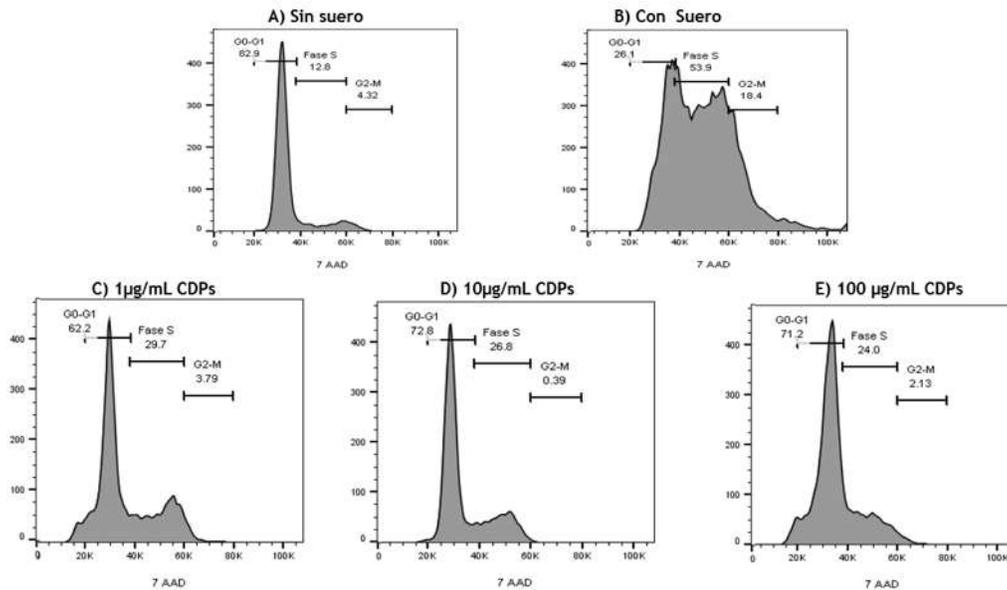


**Figura 15. Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de *P. aeruginosa* en la línea celular CaCo-2.** Se muestra la distribución de células en cada fase del ciclo celular obtenida mediante la determinación del contenido de DNA por incorporación de 7-AAD. (A) Sin suero (control negativo); (B) Con suero (control positivo); (C-D-E) tratamiento con 1, 10, 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs en células CaCo-2. Los histogramas de cada tratamiento representan el análisis de 10,000 eventos por citometría de flujo.

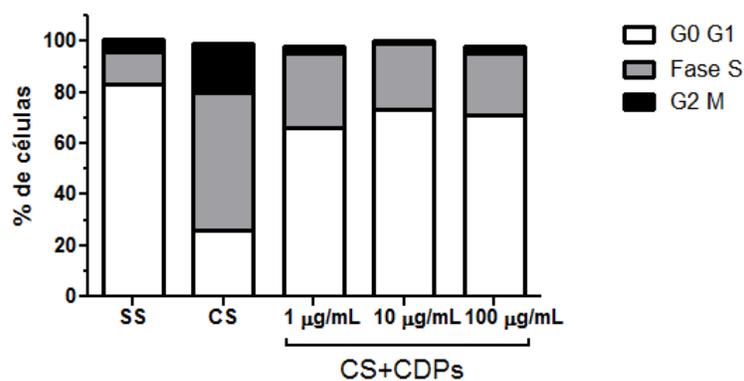


**Figura 16. Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de *P. aeruginosa* en la línea celular CaCo-2.** Porcentajes de células distribuidas en cada una de las fases del ciclo celular, después de 24 H de tratamiento con la mezcla de los CDPs. Los porcentajes corresponden al ensayo de citometría de flujo por incorporación de 7AAD. En recuadro blanco se muestra las fases G0-G1, en gris la fase de síntesis (S) y en negro las fases G2-M (Mitosis) del ciclo celular correspondiente a las células CaCo-2.

Con respecto a la línea celular HeLa tratadas con la mezcla de los CDPs el porcentaje de células en la fase G0/G1 se incrementó a 62 y 71% respectivamente, mostrando diferencias significativas con respecto al medio con suero (**Figura 17 y 18**). Con relación a la fase S, en línea celular HeLa la mezcla de los CDPs causó decremento significativo en el porcentaje de células. El porcentaje de células en la fase G2/M disminuyó en un 90% con 100 µg/mL de la mezcla de CDPs con respecto a las células sin tratamiento. Estos resultados indican un arresto de las células en la fase G0/G1, con la consecuente disminución en la proporción de células en la fase S y G2/M. La **Figura 17**, muestra el perfil del ciclo celular para la línea celular HeLa en presencia de los CDPs. En la gráfica 18 se indican los porcentajes de células distribuidas cada una de las fases del ciclo celular, después del tratamiento con los CDPs.



**Figura 17. Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de *P. aeruginosa* en la línea celular HeLa.** Se muestra la distribución de células en cada fase del ciclo celular obtenida mediante la determinación del contenido de DNA por incorporación de 7-AAD. **(A)** Sin suero (control negativo); **(B)** Con suero (control positivo); **(C-D-E)** tratamiento con 1, 10, 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs en células HeLa. Los histogramas de cada tratamiento representan el análisis de 10,000 eventos por citometría de flujo.

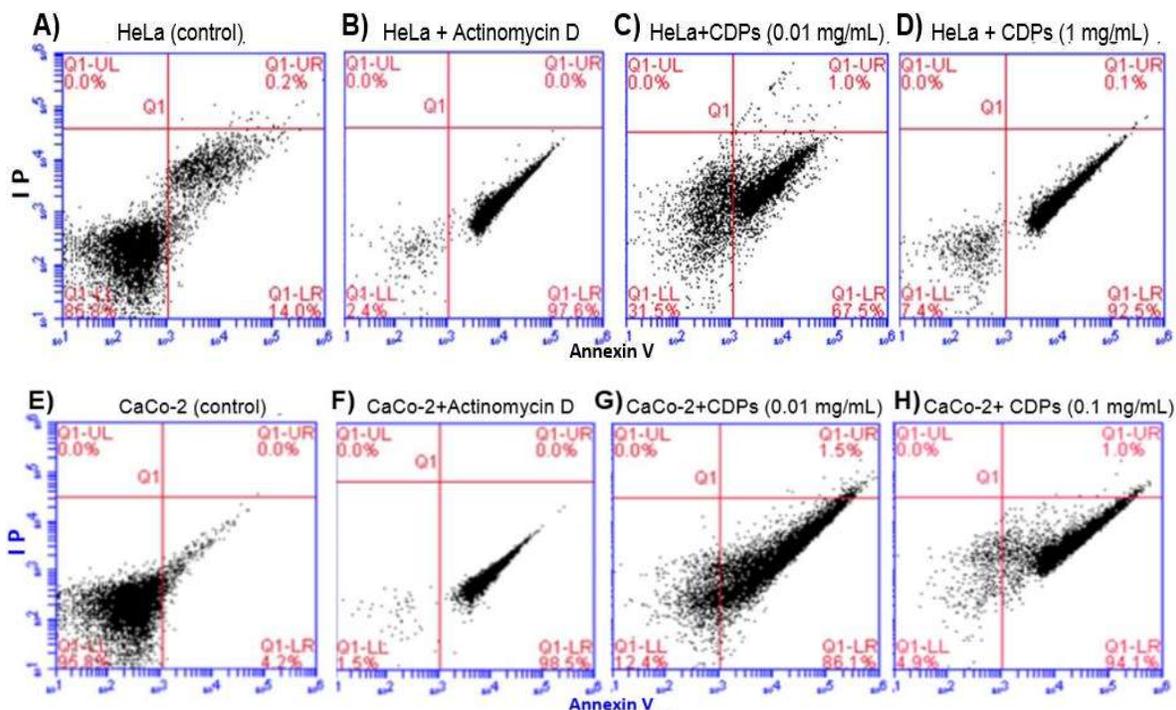


**Figura 18. Arresto del ciclo celular inducido por la mezcla de los CDP de *P. aeruginosa* en la línea celular HeLa.** Porcentajes de células distribuidas en cada una de las fases del ciclo celular, después de 24 H de tratamiento con la mezcla de los CDPs. Los porcentajes

corresponden al ensayo de citometría de flujo por incorporación de 7AAD. En recuadro blanco se muestra las fases G0-G1, en gris la fase de síntesis (S) y en negro las fases G2-M (mitosis) del ciclo celular correspondiente a las células HeLa.

### 7.5. Evaluación de la apoptosis inducida por la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa*.

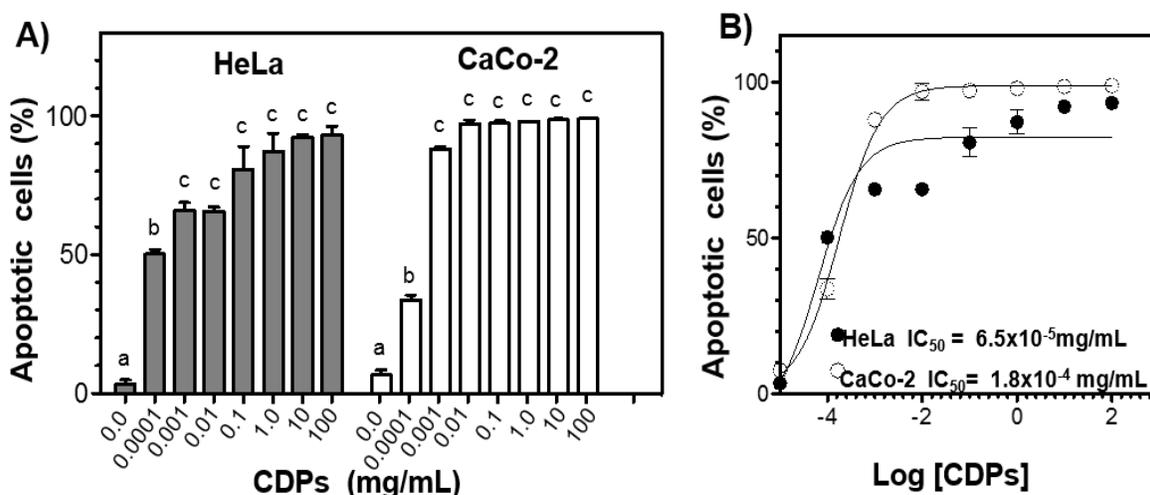
Se seleccionaron las células HeLa y Caco-2, como representantes de células cancerosas, para analizar el posible modo de citotoxicidad de los CDPs. para discriminar las células que se encontraban en necrosis y/o apoptosis se realizó un ensayo de citometría de flujo con Anexina V/IP. Los resultados obtenidos en las pruebas de citometría, se observan en la **Figura 19** donde se muestran las gráficas de puntos representativos de los diferentes tratamientos con los CDPs durante 24 H, para las células HeLa y CaCo-2 respectivamente. En donde se observa sobre el eje de la “x” la intensidad de fluorescencia correspondiente a la Anexina V (apoptosis) y en el eje de la “y” se muestra la intensidad de fluorescencia producida por el yoduro de propidio la cual indica muerte celular por necrosis, por lo tanto la población celular ubicada en el cuadrante inferior derecho es considerada como positiva para apoptosis. El tratamiento con los CDPs induce apoptosis de manera dosis dependiente hasta un 90% tanto para las células HeLa (**Figura 19 C y D**) como para las células CaCo-2 (**Figura 19 G y H**), tomando como 100% la inducción producida por la actinomicina D a 50 mM; y como control negativo se utilizó el vehículo (DMSO/H<sub>2</sub>O).



**Figura.19. Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células HeLa y CaCo-2.** Gráficas de puntos representativa de las células HeLa y CaCo-2 tratadas con la mezcla de los CDPs durante 24 H. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Actinomicina D (5mM; control positivo); (C-D) tratamiento con 0.01 y 0.1 mg/mL de la mezcla de los CDPs en células HeLa; (E) DMSO (control negativo); (F) Actinomicina D (5mM; control positivo); (C-D) Tratamiento con 0.01 y 0.1 mg/mL de la mezcla de los CDPs en células CaCo-2. Los histogramas de cada tratamiento representan el análisis de 10,000 eventos por citometría de flujo.

El tratamiento con los CDPs produce apoptosis en las células HeLa y CaCo-2, este efecto se puede observar desde la concentración de 0.001 mg/mL e incrementa de manera dependiente de la concentración hasta alcanzar una tasa de apoptosis superior al 90% (Figura. 20-A).

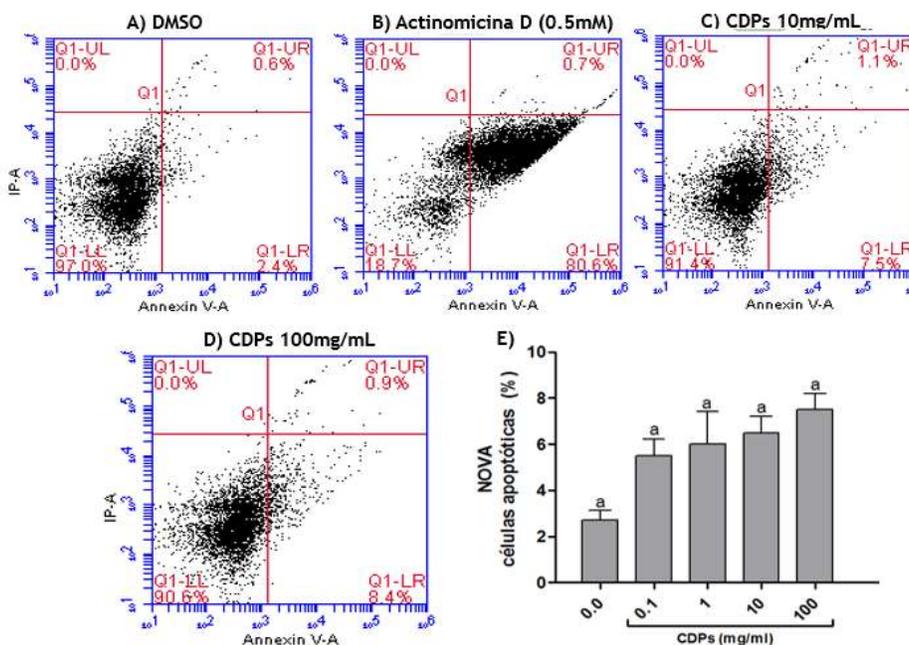
Además se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> para las células apoptóticas, los cuales fueron de  $6.5 \times 10^{-5}$  mg/mL para las células HeLa y  $1.8 \times 10^{-4}$  mg/mL para CaCo-2, respectivamente, como se muestra en la **Figura 20-B**. Estos resultados indican que una vía apoptótica está implicada en la inhibición de la proliferación celular causada por la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1.



**Figura 20. Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células HeLa y CaCo-2. (A)** Porcentajes de células apoptóticas de las líneas celulares HeLa y CaCo-2. **(B)** Análisis de regresión no lineal para las células apoptóticas causada por la mezcla de los CDPs. Intervalo de confianza de 95% ( $p < 0.001$ ). Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO) ( $p < 0.05$ ) se muestran en letras.

Con la finalidad de analizar un posible efecto de los CDPs en células normales se realizó un ensayo de citometría de flujo con Anexina V/IP en fibroblastos de pulmón humano.

Cabe mencionar que dichas células provienen de un cultivo primario no canceroso y se cuenta solamente con cinco pasajes celulares, por lo cual las células fueron estimuladas con las concentraciones que mostraban mayor porcentaje de apoptosis en células tumorales. Los resultados obtenidos en las pruebas de citometría, se observan en la **Figura 21**, donde se muestran las gráficas de puntos representativas de los diferentes tratamientos con los CDPs durante 24 H (**Figura 21-A**) y los porcentajes de apoptosis en la **Figura 21-B**, donde se observa que las células no se encuentran afectadas con ninguna de las concentraciones utilizadas.

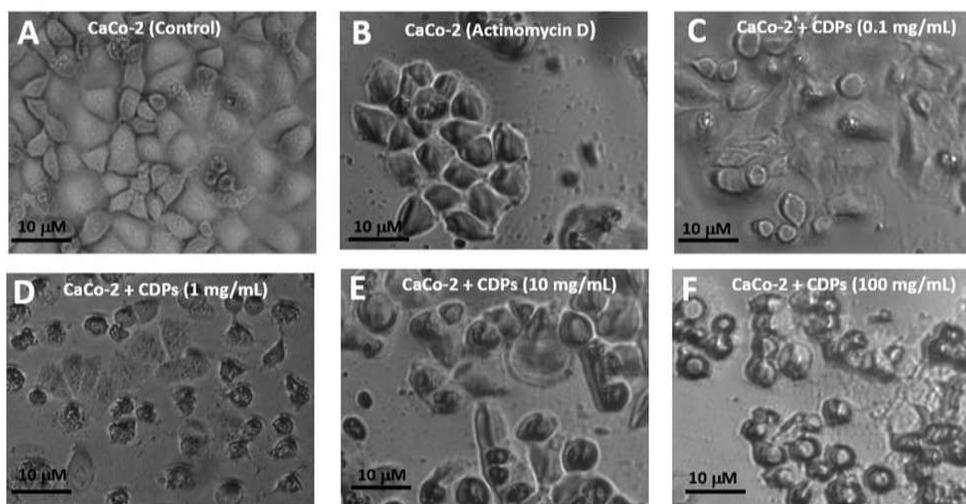


**Figura.21. Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en el cultivo primario de fibroblastos de pulmón de origen humano (NOVA). (A-D)** Grafica de puntos representativa de los tratamientos de las células NOVA. **(A)** DMSO 0.1% (control negativo); **(B)** Actinomycin D (5 mM; control positivo); **(C-D)** tratamiento con 1 y 100 mg/mL de la mezcla de los CDPs; **(E)** Porcentajes de apoptosis en células NOVA después de 24 H de

tratamiento. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO) ( $p < 0.05$ ) se muestran en letras.

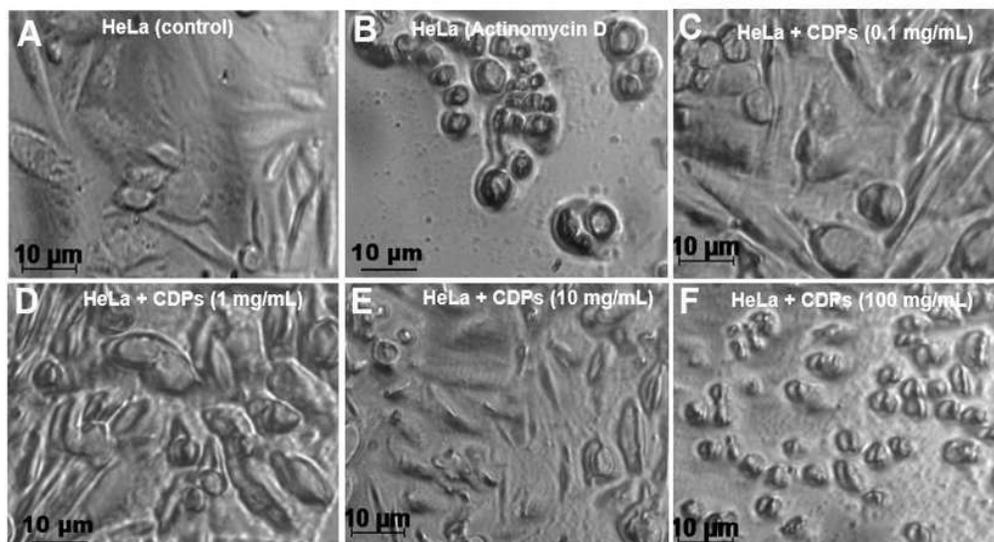
### 7.6. Cambios morfológicos en las líneas celulares cancerosas y no cancerosas inducidos por la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa*.

Además de los ensayos de citometría de flujo con Anexina V/IP, se observó la morfología de las células tratadas con la mezcla de los CDPs durante 24 H. Las células HeLa y CaCo-2 mostraron claras afectaciones ya que adoptaron una morfología redonda y de menor tamaño en comparación con las células control sin tratamiento (**Figura. 22 y 23**).



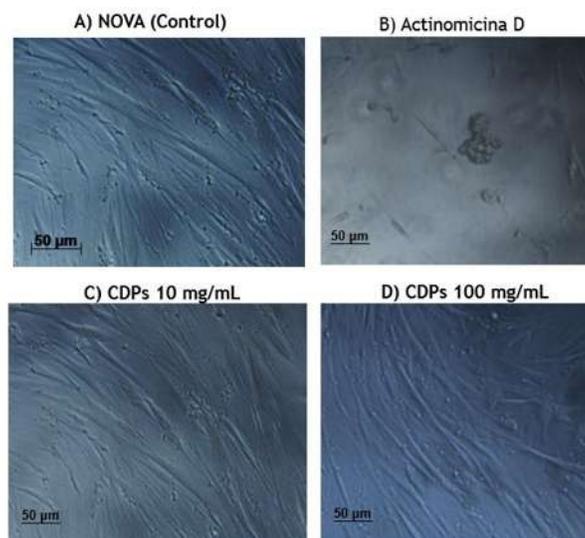
**Figura 22. Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células CaCo-2.** Fotografías tomadas con microscopía de campo claro con el objetivo 20X. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Actinomicina D (5mM; control positivo); (C-F) tratamiento (24 H) con 0.1, 1, 10 y 100 mg/mL de la mezcla de los CDPs en células CaCo-2.

Es importante mencionar que estos cambios son característicos de las primeras etapas de la apoptosis, en la cual se presenta una disminución del tamaño nuclear, y aspecto de burbuja de la membrana como se observa en la **figura 22-23**.



**Figura 23. Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células HeLa.** Fotografías tomadas con microscopía de campo claro con el objetivo 20X. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Actinomicina D (5mM; control positivo); (C-F) tratamiento (24 H) con 0.1, 1, 10 y 100 mg/mL de la mezcla de los CDPs en células HeLa.

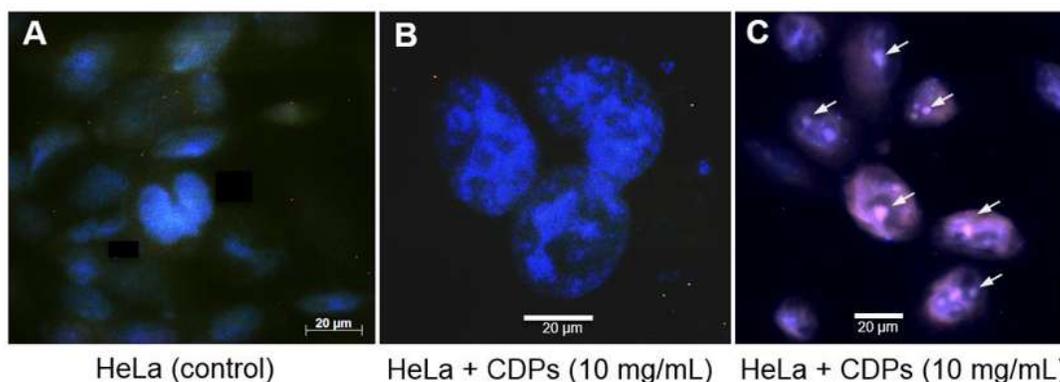
Por otro lado las células NOVA (células no cancerosas) no mostraron diferencias en su morfología con el tratamiento de los CDPs, lo que es congruente con los resultados del ensayo de viabilidad donde no se encontró inhibición de la misma.



**Figura 24. Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en fibroblastos de pulmón de origen humano (NOVA).** Fotografías tomadas con microscopía de campo claro con el objetivo 20X. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Actinomicina D (5mM; control positivo); (C-D) tratamiento (24 H) con 10 y 100 mg/mL de la mezcla de los CDPs en células CaCo-2.

Otra de las características dentro del proceso de muerte celular programada, es la condensación del material genético por lo que se realizó el marcaje de los ácidos nucleicos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), se observó en la línea celular Hela la cual fue tratada con los CDPs (10 mg/mL).un núcleo más fragmentado en comparación con las células sin tratamiento.

En conjunto estos resultados sugieren fuertemente que los CDPs están induciendo apoptosis en las líneas celulares cancerosas, mientras que en las células no cancerosas son insensibles a los mismos.



**Figura 25. Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células HeLa** Fotografías tomadas con microscopía confocal con el objetivo de 20X y 40X. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B-C) Tratamiento con 10 mg/mL de la mezcla de los CDPs en células HeLa. Después del tratamiento se incrementó el número de núcleos apoptóticos y la condensación nuclear se observó en las células tratadas durante 24 H con la mezcla de los CDPs con respecto a las células control. Las flechas muestran los núcleos apoptóticos.

### 7.7. Evaluación de la apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa*

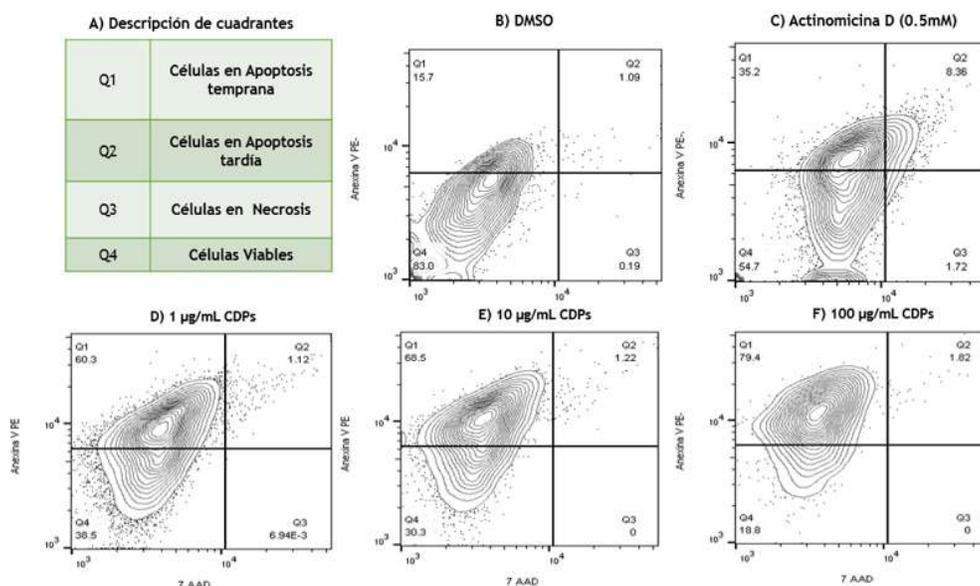
El proceso de muerte celular programada conocida como apoptosis implica reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que concluyen con su muerte de una forma ordenada. La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos característicos, donde inicialmente la membrana plasmática se altera y se visualizan protuberancias irregulares donde la fosfatidil serina de la cara interna de la membrana celular pasa hacia la cara externa de la membrana. La Anexina V es una proteína que posee una gran afinidad por la fosfatidil serina. Por ello, acoplada a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de posibles células apoptóticas, además el uso simultáneamente de un colorante supravital permite el reconocimiento de células que no tienen intacta su membrana plasmática.

Por ello, junto con la Anexina V se utilizó un colorante supravital, el 7-amino-actinomicina D (7-AAD) que se une al DNA de las células.

Por lo anterior se ha propuesto que la expresión únicamente de fosfatidil serina (Anexina V+, 7AAD-), se consideran células que están iniciando el proceso de apoptosis “apoptosis temprana” y las células que son positivas para la anexina V y el colorante supravital (Anexina V+, 7AAD+) se consideran células en “apoptosis tardía”. Además las células que únicamente tiene dañada su membrana y no expresan fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática (Anexina V-, 7AAD+), se conocen como “células necróticas”. Por lo tanto se evaluaron diferentes tiempos de tratamiento con los CDPs (2, 6 y 18 H), en las líneas celulares cancerosas CaCo-2, HeLa y MCF-7, utilizando como control de células normales (no cancerosas), mononucleares de sangre periférica (PBMC).

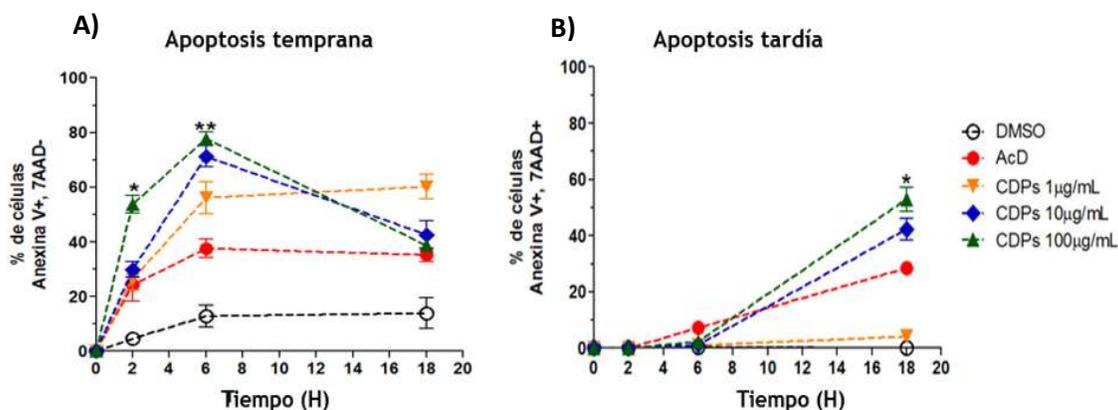
En la **Figura 26** se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de Anexina V/7AAD para las células CaCo-2, donde se observan algunas graficas representativas después de 6 H de tratamiento con la mezcla de los CDPs. En el panel A se describen los cuadrantes que corresponden a células en apoptosis temprana, tardía y necrosis.

Los tratamientos durante 6 H con las diferentes concentraciones de la mezcla de los CDPs desplazaron las células únicamente al cuadrante Q1, el cual corresponde a un proceso de apoptosis temprana, en contraste con el control positivo donde se observaron células tanto en apoptosis temprana (35.2%), como en apoptosis tardía (8.3%). No se observaron diferencia 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la mezcla de CDPs en la inducción de células en apoptosis temprana (60%), sin embargo a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la mezcla de CDPs, se encontró un incremento del porcentaje de células en apoptosis temprana (79%).



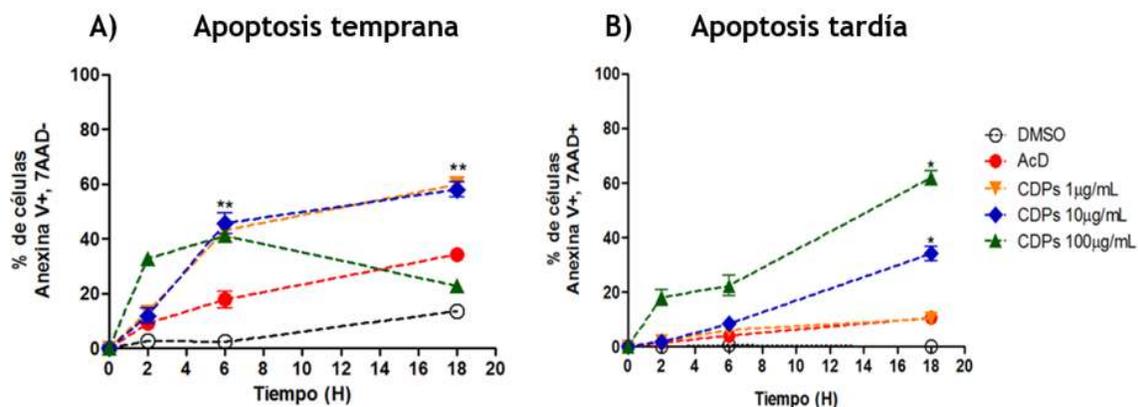
**Figura.26. Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células Caco-2.** Gráficas de puntos representativas de los tratamientos durante 6 H con la mezcla de CDPS en las células CaCo-2 **(A)** Descripción de los cuadrantes de las gráficas de puntos; **(B)** DMSO 0.1% (control negativo); **(C)** Actinomicina D (control positivo) **(D-E-F)** tratamientos con 1, 10 y 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs Las gráficas de puntos de cada tratamiento representan el análisis de 10,000 eventos mediante citometría de flujo.

Al evaluar una cinética de tiempo con las diferentes concentraciones de estímulos de la mezcla de CDPs en células CaCo-2, se observa **(Figura 27)**, que dentro de las primeras horas de tratamiento (2 y 6 H), las células estimuladas con 10 y 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs se encuentran en apoptosis temprana (más del 70%); sin embargo, a las 18 H de tratamiento con la mezcla de los CDPs más del 50% de células se encuentran en apoptosis tardía **(Figura 27-B)**



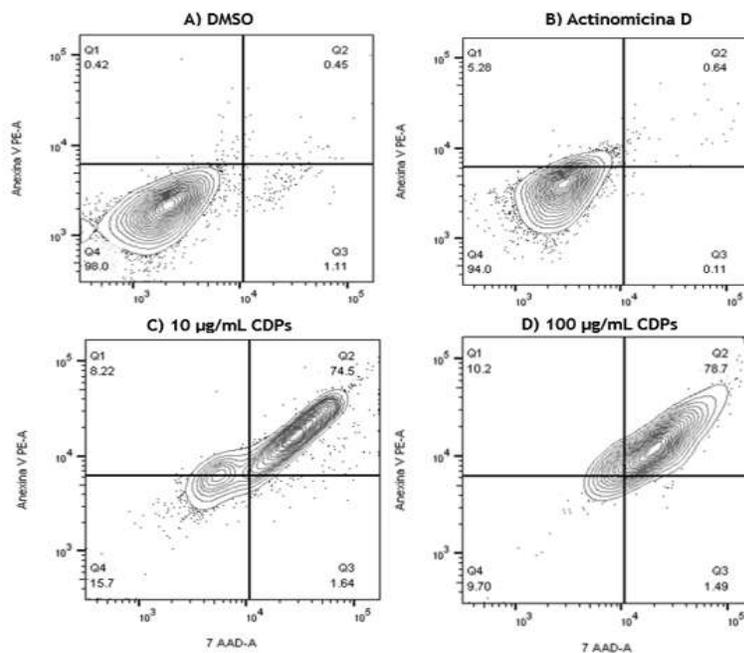
**Figura 27. Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células Caco-2. (A)** Porcentajes de células en apoptosis temprana. **(B)** Porcentajes de células en apoptosis tardía. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO 0.1%) ( $p < 0.05$ ) se muestran en asterisco.

Con respecto a la línea celular HeLa tratada con la mezcla de los CDPs se observa un efecto similar al mostrado en las células CaCo-2, ya que el porcentaje de apoptosis tardía se incrementó hasta más de un 50% al ser estimuladas durante 18 H con 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs, estos resultados muestran diferencias significativas con respecto al control sin tratamiento (**Figura 28**).

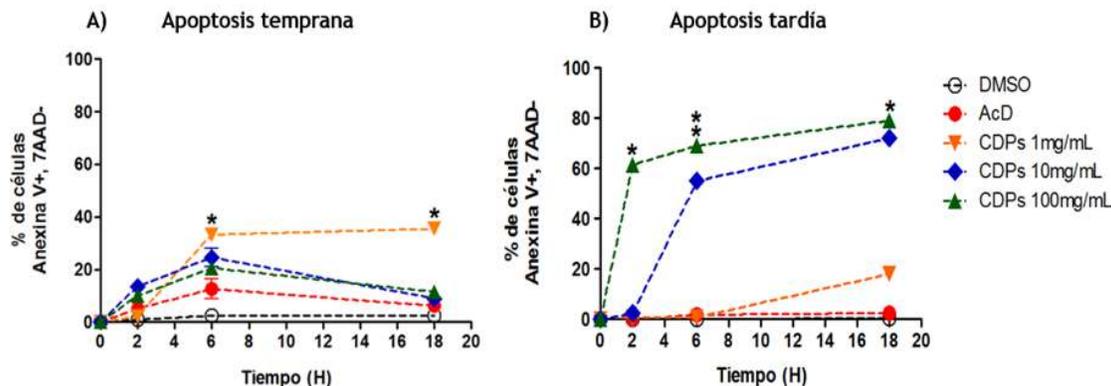


**Figura 28. Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células HeLa. (A)** Porcentajes de células en apoptosis temprana. **(B)** Porcentajes de células en apoptosis tardía. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO 0.1%) ( $p < 0.05$ ) se muestran en asteriscos.

Interesantemente la evaluación de apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs en las células MCF-7, mostró un efecto más temprano, dentro de las primeras horas de tratamiento (2 y 6 H). Las células estimuladas con 10 y 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs se encontraron en apoptosis tardía, en un 60% y 70% respectivamente (**Figura 29 y 30**).

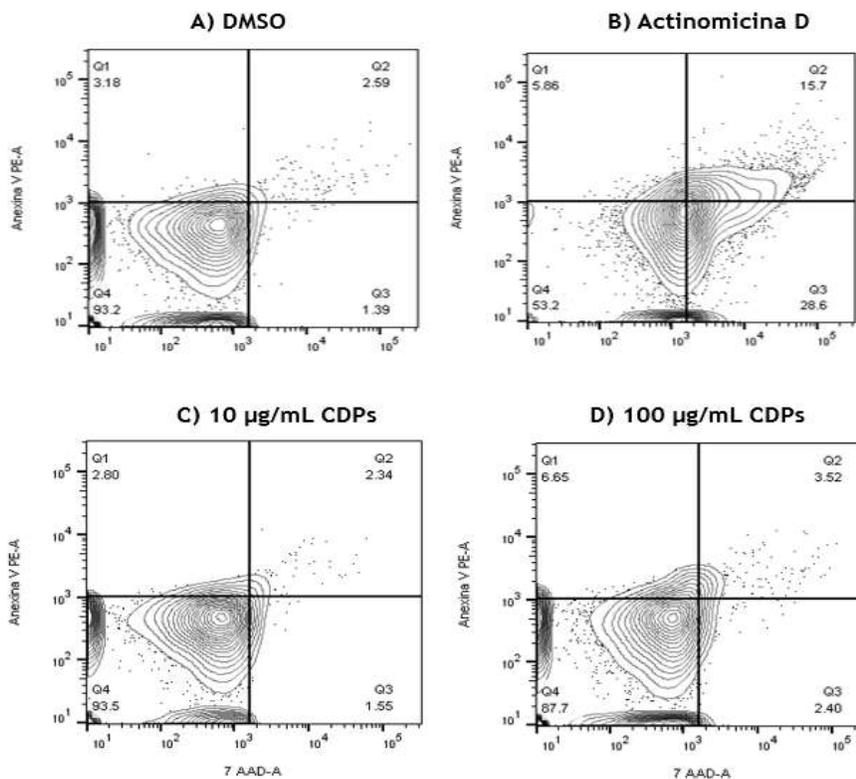


**Figura.29. Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células MCF-7.** Gráficas de puntos representativas de los tratamientos con las diferentes concentraciones de la mezcla de CDPs en las células MCF-7. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Actinomycin D (Control positivo) (C-D) tratamientos con 10 y 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs. La gráfica de puntos de cada tratamiento representa el análisis de 10,000 eventos mediante citometría de flujo.

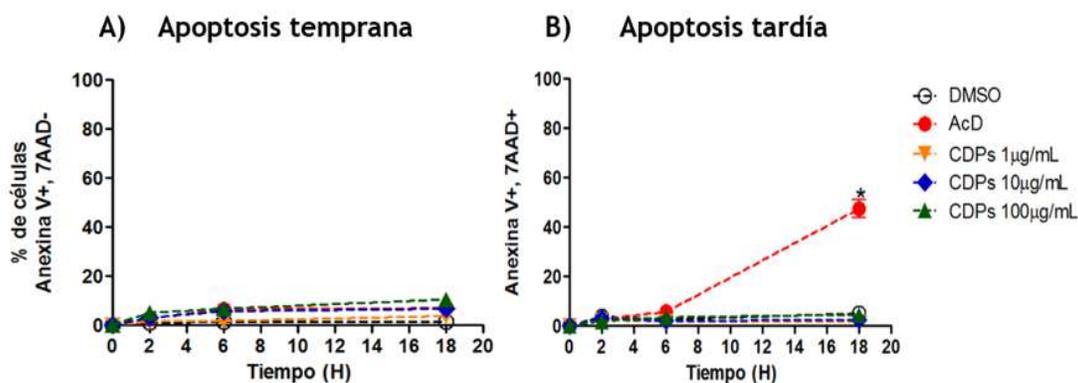


**Figura 30. Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células MCF-7. (A)** Porcentajes de células en apoptosis temprana. **(B)** Porcentajes de células en apoptosis tardía. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO 0.1%) ( $p < 0.05$ ) se muestran en asteriscos.

Se analizó el efecto de la mezcla de los CDPs en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como un modelo de células no cancerosas, para conocer si existe un efecto diferencial entre células cancerosas y no cancerosas. Los resultados obtenidos en las pruebas de citometría de flujo (**Figura 31**), no muestra ningún efecto significativo con el tratamiento de la mezcla de los CDPs durante 2, 6 y 18 H. Únicamente el tratamiento con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la mezcla de los CDPs se encontró un porcentaje moderado de apoptosis temprana (6%), el cual no es significativo con respecto al las células sin tratamiento, que muestran un 3% de apoptosis temprana (**Figura 31**).



**Figura.31. Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).** Gráficas de puntos representativa de los tratamientos con las diferentes concentraciones de la mezcla de CDPs en los PBMC. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Actinomicina D (Control positivo) (C-D) tratamientos con 10 y 100 µg/mL de la mezcla de los CDPs. La gráfica de puntos de cada tratamiento representa el análisis de 10,000 eventos mediante citometría de flujo.



**Figura 32. Apoptosis temprana y tardía inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). (A) Porcentajes de células en apoptosis temprana. (B) Porcentajes de células en apoptosis tardía. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO 0.1%) ( $p < 0.05$ ) se muestran en asteriscos.**

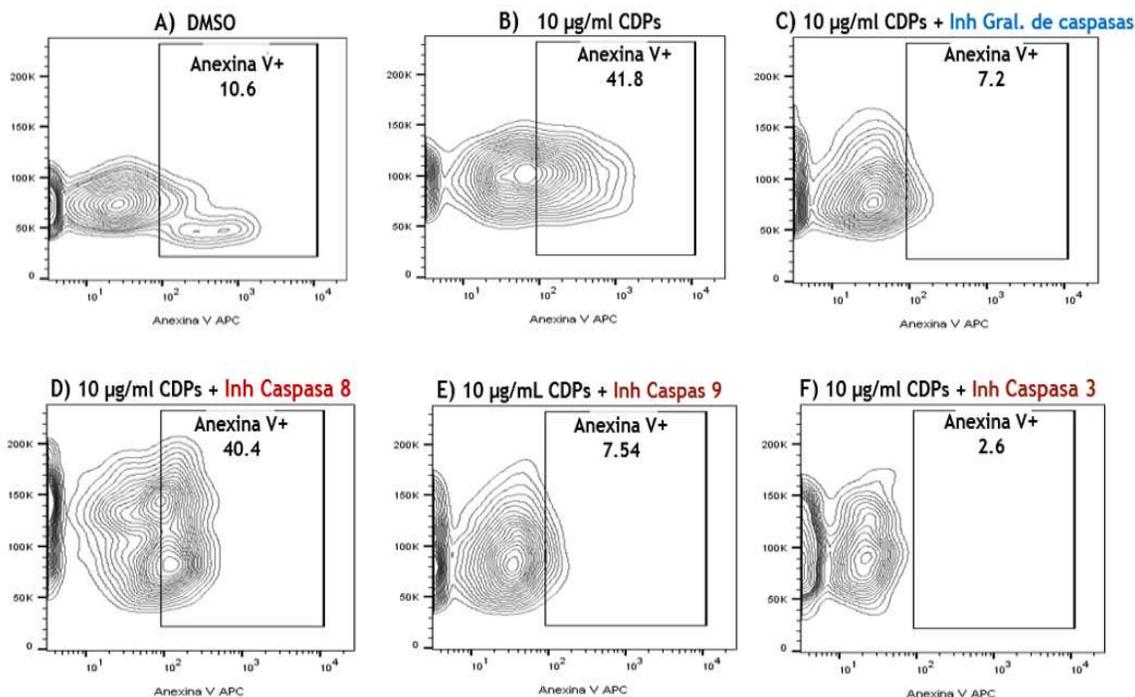
### 7.8. Participación de las caspasas en la muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* en células CaCo-2.

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Éstas se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Por lo anterior, se evaluó la participación de caspasas apoptóticas en la muerte celular inducida por los CDPS en células CaCo-2 después de 6 H de tratamiento, tiempo en cual se observó que más del 50% de las células están expresando fosfatidil serina, en la cara externa de la membrana (apoptosis temprana) (Figura 26 y 27).

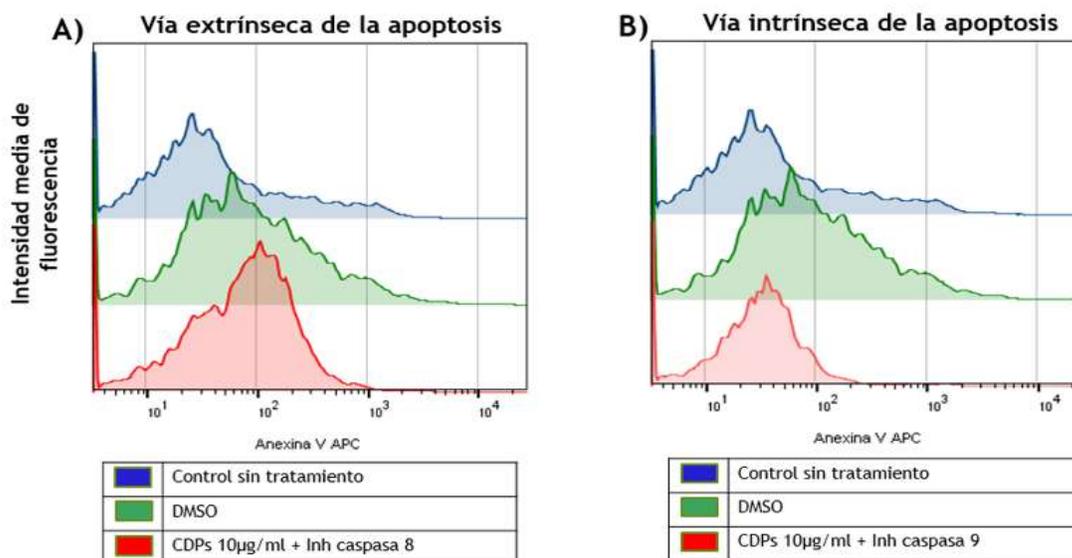
Se utilizó un inhibidor sintético no selectivo de caspasas o inhibidor general de caspasa 1, 3, 8 y 9 (Z-VAD-FMK), para corroborar SI las caspasas estaban participando en el efecto inducido por los CDPs. Se encontró que la presencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK, impidió la expresión de la fosfatidil serina, en la cara externa de la membrana de las células CaCo-2. No mostrando diferencia significativa con respecto a las células que no fueron estimuladas con la mezcla de CDPs. Este fenómeno se puede apreciar en el porcentaje de células positivas para Anexina V (**Figura 33 C**). Los resultados anteriores indican que la apoptosis mediada por caspasas, es el mecanismo de muerte celular inducido por los CDPs de *P aeruginosa*.PA01

La apoptosis puede activarse a través de: la vía intrínseca o la vía extrínseca, dependiendo del origen del estímulo de muerte. **La vía extrínseca** de la apoptosis es mediada por la activación de receptores en la superficie celular, que conducen a la activación de caspasa 8, la cual posteriormente activa a la caspasa efectora 3. Los resultados mostraron que la presencia del inhibidor de caspasas 8 (Z-IETD-FMK) no impidió la expresión de la fosfatidil serina, en la cara externa de la membrana de las células CaCo-2, ya que no mostraron diferencia significativa con respecto a las células que fueron estimuladas únicamente con la mezcla de CDPs. Este efecto se puede apreciar tanto en el porcentaje de células positivas para Anexina V el cual fue de 40.4 % con el inhibidor de caspasa 8 y 41.8 % para las células tratadas únicamente con la mezcla de los CDPs (**Figura 33 B-D**), como en la intensidad media de fluorescencia dada por la Anexina V-APC en la gráfica de histogramas (**Figura 34-A**). Lo anterior sugiere que la vía extrínseca de la apoptosis no está participando en la muerte celular programada inducida por la mezcla de los CDPs de *P aeruginosa*.

La **vía intrínseca** es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, lo cual promueve la activación de la caspasa 9, y esta a su vez activa a la principal caspasa efectora, la caspasa 3. Para conocer si la vía intrínseca de la apoptosis estaba implicada en la muerte celular inducida por los CDPS, se utilizó inhibidores específicos de caspasa 9 y caspasa 3. Los resultados mostraron que la presencia del inhibidor de caspasa 9 (Z-LEITD-FMK) y caspasa 3 (Z-DEVD-FMK), impidió la expresión de la fosfatidil serina, en la cara externa de la membrana de las células CaCo-2, ya que no mostraron diferencia significativa con respecto a las células que no fueron estimuladas con la mezcla de CDPS. Este efecto se puede apreciar tanto en el porcentaje de células positivas para Anexina V el cual fue de 7.5 y 2.6 % para el inhibidor de caspasa 9 y 3, respectivamente (**Figura 33 E-F**), como en la intensidad media de fluorescencia dada por la Anexina V-APC en la gráfica de histogramas (**Figura 34-B**). Lo que sugiere la participación de la vía intrínseca de la apoptosis en la muerte celular programada inducida por la mezcla de los CDPS.



**Figura.33. Participación de las caspasas en la muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células CaCo-2.** Gráficas de puntos representativas de los diferentes inhibidores de caspasas que se utilizaron con 10 µg/mL de la mezcla de los CDPs durante 6H. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Tratamiento con 10 µg/mL de la mezcla de los CDPs; (C) Inhibidor general de caspasas 1, 3, 8 y 9 (Z-VAD-FMK); (D) Inhibidor de caspasa 8, vía extrínseca de la apoptosis (Z-IETD-FMK); (E) Inhibidor de caspasa 9, vía intrínseca (Z-LEITD-FMK); (F) Inhibidor de caspasa 3, efectora de ambas vías de la apoptosis (Z-DEVD-FMK). La gráfica de puntos de cada tratamiento representa el análisis de 10,000 eventos mediante citometría de flujo.



**Figura.34. Participación de las caspasas en la muerte celular inducida por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células CaCo-2.** Histogramas representativos de los inhibidores de caspasas 8 y 9 correspondientes a la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis, respectivamente. Los inhibidores fueron utilizados con 10 µg/mL de la mezcla de los CDPs durante 6H. **(A)** Histogramas representativos de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la vía extrínseca de la apoptosis utilizando el inhibidor de caspasa 8 (Z-IETD-FMK) con 10 µg/mL de la mezcla de los CDPs **(B)** Histogramas representativos de la IMF de la vía intrínseca de la apoptosis utilizando el inhibidor de caspasa 9 (Z-LEITD-FMK) con 10 µg/mL de la mezcla de los CDPs Cada tratamiento representa el análisis de 10,000 eventos mediante citometría de flujo.

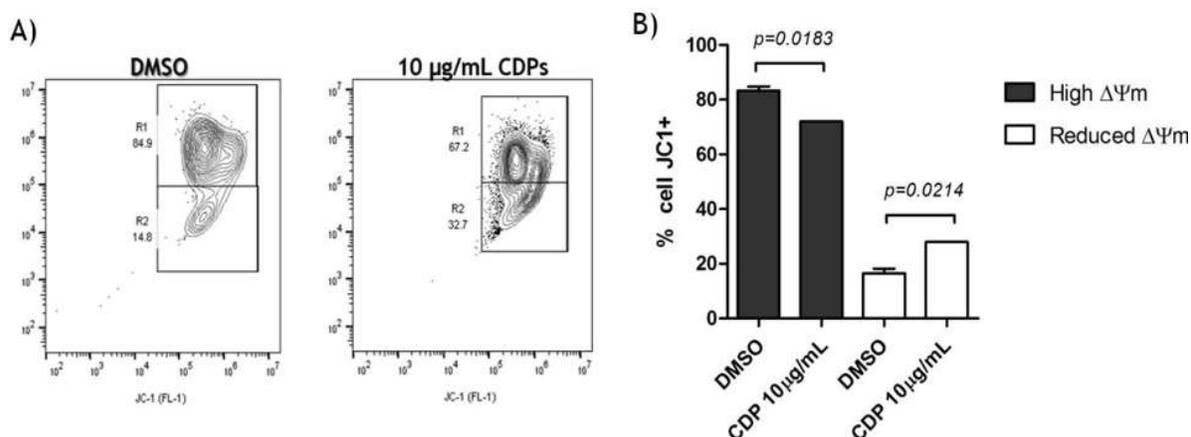
### 7.9. Disminución del potencial de membrana mitocondrial inducido por la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* en células CaCo-2.

Con los resultados anteriores es evidente que la mezcla de los CDPs inducen apoptosis a través de la vía intrínseca en la línea celular cancerosas CaCo-2 (**Figura 33 y 34**). Las mitocondrias juegan un papel central en el inicio y ejecución de la apoptosis por la vía

intrínseca, la alteración disfuncional de la mitocondria se caracteriza por un declive en su potencial de membrana lo cual ocasiona la activación de diversas proteínas que conducen a una muerte celular programada.

Por lo anterior se evaluó el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular cancerosa CaCo-2 tratadas durante 6 H con la mezcla de los CDPs, para lo cual se utilizó el fluorocromo 5,5',6,6'tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianin ioduro, también conocido como JC1. Este marcador detecta variaciones en el potencial de membrana mitocondrial sin afectar la viabilidad celular ni la respiración mitocondrial. El fluorocromo puede virar del color verde (monómeros) al naranja (agregados) dependiendo del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), por lo tanto, en condiciones normales, la mitocondria posee un potencial de membrana elevado y cuando el potencial de membrana es bajo (despolarización), el fluorocromo se encuentra formando monómeros (fluorescencia verde) que se distribuyen mayoritariamente en el citoplasma.

Los resultados mostraron que la presencia de los CDPs en las células CaCo-2 causaron una despolarización de la membrana mitocondrial, este efecto se puede apreciar en la **Figura 35-A** donde se observa que las células tratadas únicamente con el DMSO muestran un potencial de membrana mitocondrial del 84.9% ( correspondiendo a los agregados) lo cual sugiere que la mitocondria se encuentra en condiciones normales, mientras que las células tratadas con la mezcla de los CDPs presentan un 67.2 % de agregados y un 32.7 % de monómeros (**Figura 35 A-B**), indicando una despolarización de la membrana mitocondrial de las células CaCo-2, estos resultados sugieren la participación de la vía intrínseca de la apoptosis mediada por la despolarización de la membrana mitocondrial.



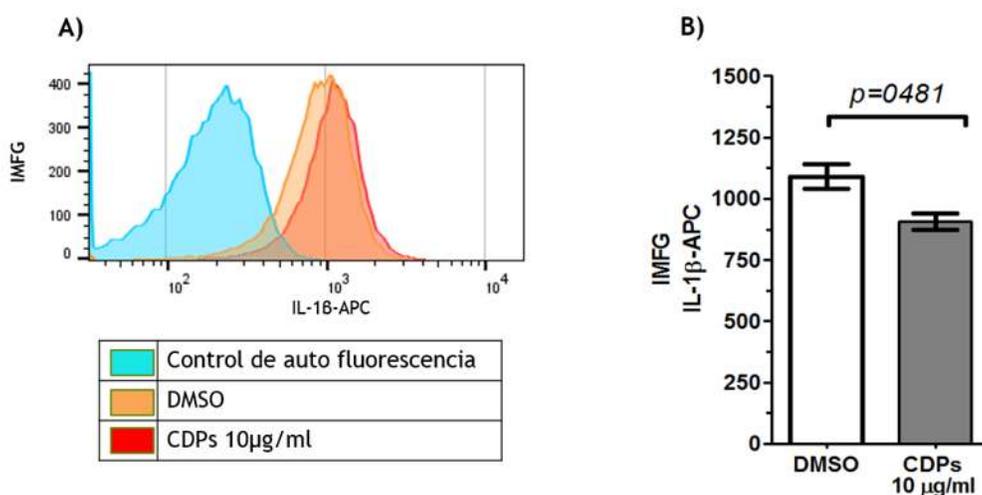
**Figura.35. Disminución del potencial de membrana mitocondrial inducido por la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* en células CaCo-2.** (A) Gráficas de puntos representativas de la fluorescencia del colorante JC1 en los canales R1 (agregados) y R2 (monómeros) inducida por 10 µg/mL de la mezcla de los CDPs en células CaCo-2 tratadas durante 6 H. La gráfica de puntos de cada tratamiento representa el análisis de 10,000 eventos mediante citometría de flujo. (B) Porcentajes del potencial de membrana mitocondrial correspondiente a los canales R1 y R2 de las células control (DMSO 0.1%) y tratadas con 10µg/mL de la mezcla de los CDPs. Se presenta la media de 2 experimentos independientes, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO) ( $p<0.05$ ) se muestran en la gráfica.

### 7.10. Efecto de la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* sobre los niveles de pro-IL-1 $\beta$ intracelular en la línea celular CaCo-2.

Para evaluar otras alternativas de muerte celular donde está involucrado el proceso inflamatorio como es la piroptosis se determinó en células CaCo-2 la presencia de pro-IL-1 $\beta$  intracelular como medida indirecta de la activación de la caspasa 1. Los resultados mostraron que el tratamiento durante 6 H con la mezcla de los CDPs disminuyó la presencia

de pro-IL-1 $\beta$  intracelular hasta un 23% con respecto a las células que no fueron estimuladas con los CDPs.

Este efecto se puede apreciar tanto en la **Figura 36-A**, donde se muestra la intensidad media de fluorescencia dada por el anticuerpo anti-pro IL-1 $\beta$  como en la gráfica de porcentajes de la IMFG, cabe resaltar que esta diferencia fue estadísticamente significativa (**Figura 36-B**).



**Figura 36. Efecto de la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* sobre los niveles de pro-IL-1 $\beta$  intracelular en la línea celular CaCo-2.** Se evaluó la presencia de la pro-IL-1 $\beta$  intracelular tratadas con los CDPs (10  $\mu$ g/mL) y se estimuló con medio completo como condición control, por citofluorimetría. **(A)** Histogramas representativos de la intensidad media de fluorescencia geométrica (IMFG) de pro-IL-1 $\beta$  en células CaCo-2. Los histogramas de cada tratamiento representa el análisis de 10,000 eventos mediante citometría de flujo. **(B)** Porcentaje de células positivas para la presencia de pro-IL-1 $\beta$  después de la estimulación con los CDPs. Gráfica representativa de cuatro determinaciones de dos experimentos independientes. Se presenta las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO 0.1%) ( $p<0.05$ ).

Estos resultados sugieren que además del proceso de apoptosis inducido por la mezcla de los CDPs en células CaCo-2, probablemente las células se estén viendo involucradas en un proceso inflamatorio mediado por la pro-IL-1 $\beta$ .

## 8. DISCUSIÓN.

Los ciclodipeptidos (CDPs) cuentan con características interesantes para la generación de nuevos fármacos, ya que los péptidos cíclicos son más biodisponibles y más estables contra la degradación por peptidasas que los péptidos lineales. (Carvalho et al 2012). Algunos CDPs inducen apoptosis en diferentes líneas celulares, como es el caso de ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) aislado de especies de *Bacillus* (Hong et al., 2008), dichos CDPs inducen la disminución en la fosforilación de la quinasa de serina/treonina (AKT1), la inactivación de AKT1 es importante en la progresión de la apoptosis (Hong, et al., 2008). Por lo anterior, en este trabajo se decidió probar el efecto de los CDPs sobre diferentes líneas celulares cancerosas (HeLa, Caco-2 y MCF-7) y en células normales (fibroblastos de pulmón humano NOVA, y células de epitelio mamario bovino CEMB). Los CDPs generaron un efecto citotóxico en células cancerosas (HeLa, CaCo-2 y MCF7), Lo cual se observó a partir de la condición de 1 mg/mL, sin embargo, este efecto no fue observado para las células no cancerosas donde se probaron concentraciones hasta de 200 mg/mL sin mostrar algún efecto citotóxico. Una explicación pudiera estar relacionadas con el tipo celular, ya que se ha demostrado que existen diferencias importantes entre la estructura de la membrana de las diferentes células cancerosas, como su contenido de colesterol (Schweizer 2009), lo cual podría explicar en parte su mayor susceptibilidad al efecto de los CDPs

Se sabe que algunos CDPs inducen arresto del ciclo celular en células cancerosas, tal es el caso del ciclo (*L-Phe-L-His*) producido por *Aspergillus ustus* el cual induce arresto del ciclo celular en células de leucemia de ratón (P 388), a concentraciones de 5  $\mu$ M muestran arresto del 40% en la fase G0/G1. Sin embargo, este efecto no se mantiene ya que cuando aumentan las concentraciones aumenta la fase de síntesis del ciclo celular (Kaneo, et al., 2000). En este estudio los CDPs de *P. aeruginosa* provocaron arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 en las líneas celulares cancerosa HeLa y CaCo-2. El porcentaje de estas células cancerosas tratadas con 10  $\mu$ g/mL de la mezcla de CDPs en la fase G0/G1 aumentó en un

59% aproximadamente y el porcentaje de células en la fase de síntesis del DNA disminuyó en un 64% respecto a las células sin tratamiento (**Figura 16-18**). Estos resultados sugieren que los CDPs además de mostrar un efecto citotóxico pueden ocasionar un arresto celular y quizá generar un tipo de muerte celular programada, ya que los puntos de control del ciclo celular se encuentran entre la fase G1 y S, donde se examina el estado nutricional, el crecimiento, la duplicación del material genético, entre otros (Cooper y Hausman., 2010) permitiendo enviar a la célula a apoptosis en caso de mostrar alguna alteración como en este caso mediante la inducción por los CDPs.

La búsqueda de nuevas moléculas con propiedades implicadas en el control del crecimiento de células cancerosas es un campo científico muy competitivo y en creciente demanda, en este sentido, las moléculas de origen natural con actividad antiproliferativa se consideran más potentes y específicas en su actividad, respecto a las moléculas de origen sintético. Una de las razones probables para esto, es que las moléculas producidas a partir de organismos biológicos, tales como los CDPs de *P. aeruginosa*, tienden a tener más centros quirales, que les dan una especificidad estereoquímica (Carvalho, et al., 2012). El ciclodipeptido sintético ciclo (*L*-Phe-*L*-Pro) es capaz de inducir apoptosis a través de la inhibición de la poli (ADP-ribosa) polimerasa en un 18% de las células después de 72 H con este CDP a 5 mM (Brauns et al., 2004). Por el contrario, en este estudio, el tratamiento durante 24 H con la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* indujeron apoptosis a una concentración inferior (~0.04 mM de la mezcla de CDP), obteniendo un 67% y 86% de apoptosis para las células HeLa y Caco-2, respectivamente (**Figura 21**). Nuestros resultados indican que la combinación CDPs de *P. aeruginosa* es más potente para inducir muerte celular programada vía apoptosis.

Uno de los retos más importantes en la terapia contra el cáncer es tener fármacos con selectividad únicamente en las células cancerosas y que no dañen las células normales así como las células de la respuesta inmunológica (Savarese et al. 2003). Interesantemente los CDPs de *P. aeruginosa* indujeron una apoptosis muy temprana en todas las líneas tumorales evaluadas y ese proceso iniciado se llevó hasta sus últimas etapas como se observó en los porcentajes encontrados de apoptosis tardía (**Figura 26-30**), lo cual nos indica que las

células que recibieron señales de muerte celular no pudieron revertir este efecto. Muchos fármacos anticancerígenos son capaces de inducir mecanismos proapoptóticos, sin embargo las células han desarrollado mecanismos para poder revertir este efecto y sobrevivir (Gore, et al., 2013) lo cual no se observó con los CDPs. Además no se encontró efecto citotóxico con los CDPs sobre monocitos humanos lo cual es muy relevante al tratarse de una de las células más importantes de la respuesta inmunitaria antitumoral (Savarese et al. 2003).

El entendimiento de los mecanismos involucrados en la apoptosis de los fármacos anticancerígenos a nivel molecular permitirá el mejoramiento y/o desarrollo de dichos compuestos, los CDPS reportados que han mostrado efecto anticancerígeno se desconoce aún en que vía de inducción de apoptosis están participando (Hong et al., 2008; Kaneo, et al., 2000). Interesantemente en este trabajo se demostró que la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* activan la vía intrínseca (**Figura 33-34**) de la apoptosis donde participa activamente la mitocondria (**Figura 35**). Y no se encontró participación de la vía extrínseca lo que sugiere que los CDPs no están interaccionando con receptores de muerte celular lo que sugiere que difunden libremente al interior desacoplando un proceso celular y como consecuencia enviando la célula a apoptosis, esto sugiere que su efecto podría ser de amplio espectro en una gran variedad de linajes de células cancerosas al no depender de receptores de membrana. Esta característica mencionada sumada con su alta resistencia a la degradación por proteasa y su alto grado de biodisponibilidad coloca a los CDPs de *P. aeruginosa* como candidatos prometedores para la terapia contra el cáncer.

Por otra parte se ha descrito otras variantes de muerte celular como es la piroptosis en la cual su principal característica es la activación de un complejo multiproteico intracelular llamado inflammasoma que activa la caspasa 1 transformando la pro-IL-1 $\beta$  en su forma activa IL-1 $\beta$  lo que propicia que esta se libere al medio (Franchi et al., 2009). Se sabe que la IL-1 $\beta$  es una citosina pro-inflamatoria que intensifica el proceso inflamatorio lo que conlleva al reclutamiento de células del sistema inmunitario principalmente polimorfonucleares lo que va a generar un ambiente de estrés oxidativo con la finalidad de controlar o eliminar el

---

agente agresor sin embargo este proceso inicial (activación de caspasa 1) lleva a la célula a su muerte celular (Martinon et al., 2002), compartiendo características descritas en la apoptosis como la permeabilidad de la membrana, la expresión de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana y el desacoplamiento del potencial mitocondrial (Fink y Cookson., 2005). Sin embargo esta variante de muerte celular inducida por los CDPs de *P. aeruginosa* requiere de mayor estudios.

La idea de que la muerte celular inducida por los CDPs de *P. aeruginosa* es a través de la piroptosis (**Figura 36**) es muy factible debido a que se encuentra documentado que la activación del inflamasoma es mediada por factores de virulencia de diferentes patógenos como *Salmonella typhimurium*, y algunas toxinas al funcionar como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMs) o a microorganismos (MAMPs) (Gurung et al., 2015). Además se conoce que los patrones moleculares asociados a daño celular como lo son las concentraciones de ATP extracelular también son capaces de activar el inflamasoma lo que sugiere que la piroptosis pudiera ser un mecanismo involucrado de forma indirecta o directa (Gurung et al., 2015).

---

## 9. CONCLUSIÓN

La mezcla de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) producidos por *P. aeruginosa* PAO1 inducen arresto del ciclo celular y muerte celular programada únicamente en células cancerosas a través de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, con una probable participación del Inflamasoma.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abreu, P., Farias, P., Paiva, G., Almeida, A., Morais, P. 2014. **Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard.** *BioMed Central Microbiology*. (14):118-122.

Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, E. 2005. **Biología “La vida en la tierra”.** 6<sup>ta</sup> edición. Editorial. Pearson. Prentice Hall. México. (6):980.

Belin, P., Moutiez, M., Lautru, S., Seguin, J., Pernodet, J., Gondry, M. 2012. **The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways.** *Natural Product Reports*. (29):961-979.

Brauns, S., Milne, P., Naudé, R., Venter, M. 2004. **Selected cyclic dipeptides inhibit cancer cell growth and induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells.** *Anticancer Research*. (24):1713–1719.

Borthwick, A. 2012. **2, 5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products.** *Chemical Reviews*. (112):3641-3716.

Carrington, E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei Y., Werner, H., 2006. **The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8.** *Molecular Cell*. **22**:599-610.

Carvalho, M., Abraham, W. 2012. **Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines.** *Current Medicinal Chemistry*. (19):3564–3577.

Cho, S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, D., Guildford, M., Chan, K. 2009. **Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation.** *Cell* (137):1112-1123.

Cohen, M. 1997. **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochemical Journal.* (326):1-16.

Cooper, G., Hausman, R. 2010. **La célula.** 5<sup>ta</sup> Edición Editorial: Marban, Madrid (1): 818.

De Duve, C., Wattiaux, R. 1966. **Functions of lysosomes.** *Annual Review of Physiology* (28): 435-492.

Earnshaw, W., Martins, L., Kaufmann, S. 1999. **Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.** *Annual Review of Biochemistry* (68):383-424.

Elmore, S. 2007. **Apoptosis: A review of programmed Cell Death.** *Toxicologic Pathology.* (35):495-516.

Fazi, B., Bursch, W., Fimia, M., Nardacci, R., Piacentini, M., Di Sano, F., Piredda, L. 2008. **Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells.** *Autophagy* (4):435-441.

Feinbaum, R., Urbach, J., Liberati, N., Djonovic, S., Adonizio, A., Carvunis, A., Ausubel, F. 2012. **Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model.** *PLoS Pathogens.* (8):100-281.

Fink, S., Cookson, T. 2005. **Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells.** *Molecular and Cellular Biology.* (73):1907–1916

Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz, R., Núñez, G. 2009. **The inflammasome: a caspase-1 activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis.** *Nature Immunology.* (10):241-247.

Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz, R., Ozkurede, U., Yun-Gi, k., Chakrabarti, A., Gale, M., Silverman, R., Colonna, M., Shizuo, A., Núñez, G. 2015. **Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3 Inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K<sup>+</sup> Efflux.** *The Journal of Immunology.* (193):4214-4222.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. 2007. **Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.** *Cell Death & Differentiation* (14):1237-1243.

GLOBOCAN 2012. **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.**

Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. 2006. **Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. (57):639-647.

Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C. 2009. **Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes.** *Nature Chemical Biology*. (6): 414-420.

Gonzalez, J., Keshavan, N. 2006. **Messing with bacterial quorum sensing.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (70): 859-875.

Gore, L., Gregori, J., Porter, C. 2013. **Targeting developmental pathways in children with cancer: what price success?** *Lancet Oncology*. (2):70-78.

Grunewald, J., Marahiel, A. 2006. **Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (70): 121-146.

Gurung, P., Lukens, J., Kanneganti, T. 2015. **Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome.** *Trends in Molecular Medicine*. (21): 1471-4914.

Hong, S., Moon, B., Yong, Y., Shin, S., Lee, Y., Lim, Y. 2008. **“Inhibitory effect against Akt by cyclic dipeptides isolated from Bacillus sp.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*. (18):682–685,2008.

Hoskin, D., Ramamoorthy, A. 2008. **Studies On Anticancer Activities Of Antimicrobial Peptides.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes.* (1778): 357-375.

Igney, F., Krammer, P. 2002. **Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis.** *Nature Reviews Cancer.* (2):277–88.

INEGI 2014. **Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama** (Aguascalientes).

Jayaseelan S., Ramaswamy D., Dharmaraj S. 2013. **Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights.** *World Journal Microbiology Biotechnology.* 30(4):1159-68.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. 2011. **Global cancer statistics.** *CA: a cancer journal.* (2): 69-90.

Jing, J., Bakar, M., Mohamed, M., Rahmat, A. 2011. **Effect of selected Biosenbergia species on the proliferation of several cáncer cell lines.** *Journal of Pharmacology and Toxicology.* (6):272–282.

Juhas, M., Eberl, L., TummLer, B. 2005. **Quorum sensing: the power of cooperation in the world of Pseudomonas.** *Environmental Microbiology.* (7): 459-471.

Kaneo, K., Shinkichi, Kohno., Tohru, A., Takeo, H., Jun, K., Michiko, M., Hiroshi, K., Hirokatsu, S., Isao U. 2000. **Antitumor activity of Phenylahistin in vitro and in vivo.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* (22):2847–2852.

Karatuna, O., Yagci, A. 2010. **Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in Pseudomonas aeruginosa respiratory isolates.** *Clinical Microbiology and Infection.* (16): 1770 1775.

Kerr, J., Winterford, C., Harmon, B. 1994. **Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy.** *British Journal of Cancer.* (73):2013-26.

Kerr, J., Wyllie, A., Currie, A. 1972. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *British Journal of Cancer.* (26), 239–57.

Kerr, J. 2002. **History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept.** *Toxicologic Pathology* (4):181–182.

Lind, H., Sjögren, J., Gohil, S., Kenne, L., Schnürer, J., Broberg, A. 2007. **Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains.** *FEMS Microbiology Letters.* (2):310-5.

Liu, Q., Qiu, J., Liang, M., Golinski, J., Leyen, K., Jung, E., You, Z., Lo, H., Degterev, A., y Whalen, J. 2014. **Akt and mTOR mediate programmed necrosis in neurons.** *Cell Death & Disease* (5):1038-1069.

Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. 2002. **The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta.** *Molecular Cell.* (10):417-426.

Meng, X., Zhong, J., Shuying, L., Mollianne, M., Gonzalez, A. 2012. **A New Hypothesis For The Cancer Mechanism.** *Cancer and Metastasis Reviews.* (31): 247-268.

Miller, J.R. 2001. **The Wnts.** *Genome biology* (3) (1): 1-15.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, M., Klionsky D. 2008. **Autophagy fights disease through cellular self-digestion.** *Nature.* (7182):1069-75.

Mizushima, N., Komatsu, M. 2011. **Autophagy: renovation of cells and tissues.** *Cell* (147): 728-741.

Morgan, A., Wenliang, W., Christelle, M., Federico, C., David, E., Paul, M., Nathan, A. 2010. **Staphylococcus aureus Nonribosomal Peptide Secondary Metabolites Regulate Virulence.** *Science.* (329): 294-296.

Nauliand, A., Nauli, M. 2013. **Intestinal transportasa potential determinant of drug bioavailability.** *Current Clinical Pharmacology.* (8):247–255.

Newton, K., Dugger, L., Wickliffe, E., Kapoor, N., Almagro, C., Vucic, D., Komuves, L., Ferrando, E., French, M., Webster, J. 2014. **Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis.** *Science* (343):1357-1360.

Nezis, P., Shrivage, V., Sagona, P., Lamark, T., Bjorkoy, G., Johansen, T., Rusten, E., Brech, A., Baehrecke, H., Stenmark, H. 2010. **Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late Drosophila melanogaster oogenesis.** *The Journal of Cell Biology* (190):523-531.

Ng, W., Bassler, B. 2009. **Bacterial quorum-sensing network architectures.** *Annual Review of Genetics.* (43):197-222.

Norbury, C., Hickson, I. 2001. **Cellular responses to DNA damage.** *Annual Review of Pharmacology.* (41):367–401.

Núñez, R., Escalona, J. 2005. **Ciclo celular.** UNAM. Recuperado de <http://sciencestage.com/uploads/text/4HJWiH3BvCBInnmQe1.pdf>.

Organización Mundial de la Salud. 2012. **Cáncer.** Nota descriptiva N°297, febrero 2012. Recuperado el 17 de julio de 2013, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Ortiz, R., Díaz, C., Martínez, M., Del Rio, R., Campos, J., Lopez, J. 2011. **Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (108): 7253-7258.

Pasparakis, M., Vandenabeele, P. 2015. **Necroptosis and its role in inflammation.** *Nature.* (517):311–320

---

Pazo, C., Álvarez, C., Martínez, L., Pérez, G., Antón, T. 2012. **Apoptosis, & cáncer.** *Revista Internacional de Grupos en Investigación en Oncología.* (1):23-28

Rai, N., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V. 2005. **Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing.** *International Journal of Lower Extremity Wounds.* (4):138–44.

Rojas, M., Siham, S., Berrueta, L. 2009. **Muerte celular programada: Activación y mecanismos de regulación.** *Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela.* (4): 92-106

Ruddon, R. 2007. **Cancer Biology.** 4th ed. Edition. Oxford, University Press, New York.

Saito, D., Suyama, M. 2015. **Linkage disequilibrium analysis of allelic heterogeneity in DNA methylation.** *Epigenetics.* (17):110-2.

Salvesen G. y Renatus M. 2002. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell.* **2**: 256-7.

Savarese, F., Savy, G., Vahdat, L., Wischmeyer, P., Corey, B. 2003. **Prevention Of Chemotherapy And Radiation Toxicity With Glutamine.** *Cancer Treatment Reviews.* (6):501-513.

Schweizer, F. 2009. **Cationic Amphiphilic Peptides With Cancer-Selective Toxicity.** *European Journal Of Pharmacology.* (625): 190-194.

Schworer, S., Smirnova, I., Kurbatova, I., Bagina, U., Churova, M., Fowler, T., Roy, L., Degterev, A., Poltorak, A. 2014. **Toll-like Receptor-Mediated Downregulation of the Deubiquitinase CYLD Protects Macrophages from Necroptosis in Wild-Derived Mice.** *The Journal of Biological Chemistry.* (20):14422-33.

Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa, S., Thompson, B., Tsujimoto, Y. 2004. **Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death**

**dependent on autophagy genes.** *Nature Cell Biology.* (6):1221-1228.

Shi, Y. 2004. **Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.** *Molecular Cell.* (9):459-70.

Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrenner, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D., Lagrou, M., Garber, R., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook, S., Yuan, Y., Brody, L., Coulter, S., Folger, K., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, K., Wu, Z., Paulsen, I., Reizer, J., Saier, M., Hancock, R., Lory, S., Olson, M. 2000. **Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen.** *Nature.* (406):959-964.

Strieker, M., Tanovic, A., Marahiel, A. 2010. **Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics.** *Current Opinion in Structural Biology.* (20): 234-240.

Ström, K., Broberg, S., Schnürer, J. 2002. ***Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptidescyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid.** *Environmental Microbiology.* (68): 4322–4327.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden, T., Kroemer, G. 2010. **Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* (11):700–714.

Vogelstein, B., Kinzler, W. 2004. **Cancer Genes And The Pathways They Control.** *Nature Medicine.* (10):789-799.

Wu, W., Liu, P., Li, J. 2011. **Necroptosis: an emerging form of programmed cell death.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (82):249-258.

Xiancui, L., Sergey, D., Ying, X., Xiang, X., Oi, S., Hung, P. 2006 **Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*.** *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research.* (22):201-8.

---

Zeiss, J. 2003. **The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice.** *Journal of Veterinary Pathology.* (40):481–95.