



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

TITULO

**Evaluación del efecto citotóxico de los
ciclodipéptidos bacterianos en la línea celular
humana K562 de leucemia mieloide crónica.**

TESIS REALIZADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

PRESENTA:

IBQ. Diana Elena Gómez Sánchez

DIRECTOR:

DC. Jesús Campos García

MORELIA, MICHOACÁN

MAYO, 2022

Laboratorio de Biotecnología Microbiana
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Edificio U3, Ciudad Universitaria.

IBQ. Diana Elena Gómez Sánchez. diana.gomez@umich.mx

Director de tesis: DC. Jesús Campos García. jcgarcia@umich.mx

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido”.

Carl Sagan

RESUMEN

La leucemia es una neoplasia maligna que se desarrolla en la médula ósea, produciendo grandes cantidades de glóbulos blancos inmaduros que son transportados al torrente sanguíneo. Existen 4 tipos de leucemias, una de ellas es la leucemia mieloide crónica que es una enfermedad crónica que afecta específicamente el linaje mieloide (plaquetas, eritrocitos, granulocitos y monocitos). Los tratamientos contra la leucemia logran ser efectivos, pero presentan diversos efectos secundarios afectando a los pacientes. La búsqueda de nuevas moléculas con propiedades antineoplásicas con disminuidos efectos secundarios es un campo en creciente demanda. Estudios han demostrado la actividad citotóxica de los ciclodipéptidos bacterianos (CDPs) producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en las líneas celulares HeLa, CaCo-2 y B16F0 (líneas celulares tumorales). También se comprobó que estos CDPs disminuyen el tamaño de tumores xenoinjertados en modelo de ratón. Además, encontraron que los tratamientos promovieron la restauración de la hiperactivación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. En el presente proyecto se estudió el efecto de los CDPs de *P. aeruginosa* sobre la línea celular de leucemia mieloide crónica K562. Los resultados obtenidos demostraron que los CDPs presentan citotoxicidad de manera dosis dependiente en los cultivos celulares, presentando una IC₅₀ de 3 µg/mL. Además, se estudió la producción del radical superóxido y se observó que durante las primeras horas de tratamiento se obtuvo la mayor concentración del anión, se logró la máxima concentración de superóxidos con la concentración de 0.001 mg/mL a 2 h de tratamiento. También se observó que los CDPs desencadenaron el proceso de apoptosis logrando obtener ~50% de células apoptóticas después de 4 h de tratamiento. Se concluyó en este proyecto que los CDPs de *Pseudomonas aeruginosa* producen apoptosis de manera dosis dependiente y su efecto citotóxico involucra la generación de estrés oxidativo en las células K562 de leucemia mieloide crónica. Por lo anterior se puede sugerir a los CDPs bacterianos como un fármaco con actividad antineoplásica y un potencial terapéutico en el tratamiento de leucemia mieloide crónica.

Palabras clave: Ciclodipéptidos, leucemia, K562, citotóxicos, apoptosis.

ABSTRACT

The cytotoxic effectiveness of CDPs produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in HeLa, CaCo-2, and B16-F0 cell lines (tumor cell lines) has been previously studied. Also, it has been shown that the CDPs decreased the size of xenografted tumors in murine model; also, it studied the pathways involved in the effect produced by the CDPs, finding that the treatments promoted the restoration of the hyperactivation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. In addition, elements of several signaling pathways, such as Ras-ERK, PI3K/JNK/PKA, p27Kip1/CDK1/survivin, MAPK, HIF-1, epithelium-mesenchymal transition, and cancer stem cell pathways were modified by the treatment with CDPs. The molecular model of CDPs with protein kinases involved in neoplastic processes suggests that these compounds may be interacting with the active sites of enzymes, interfering with multiple pathways involved with tumor formation and progression. On the other hand, leukemia is a type of cancer that occurs in the bone marrow, producing large numbers of immature white blood cells that are carried into the bloodstream. Chronic myeloid leukemia is a chronic disease affecting the myeloid lineage (platelets, erythrocytes, granulocytes, and monocytes). It has been shown some leukemia treatments are effective, but they develop several side effects concerning patients with these sequelae in a long term. The search for new antineoplastics without side effects is a field of growing demand. An attractive proposal is the use of bacterial cyclodipeptides. In the present project, the effect of CDPs on the K562 chronic myeloid leukemia cell line was studied. The results showed that CDPs exhibit dose-dependent cytotoxicity in cell cultures calculating an IC₅₀ of 3 µg/mL. In addition, CDPs triggered the apoptosis process, obtaining ~50% of apoptotic cells after 4 h of treatment. In addition, the production of the superoxide radical was studied, and it was shown that during the first hours of treatment the highest concentration of the anion was obtained. This project concluded that CDPs decrease cell viability and produce apoptosis in a dose-dependent manner in K562 cells with chronic myeloid leukemia. Thus, the bacterial CDPs can be suggested as drugs with antineoplastic activity with potential therapeutic in the treatment of the chronic myeloid leukemia disease.

CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	X
ÁREA EN LA QUE SE PARTICIPÓ	XI
MARCO TEÓRICO	1
I. Cáncer	1
i. Características del cáncer	1
II. Leucemia	3
i. Tipos de leucemia	4
ii. Incidencia de leucemia en México	6
iii. Tratamientos contra la leucemia	9
III. Ciclodipéptidos bacterianos	12
a) Aplicaciones biológicas de los ciclodipéptidos bacterianos	13
b) Ciclodipéptidos bacterianos como alternativa de tratamiento contra el cáncer	14
ANTECEDENTES	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
I. Medios de cultivos	22
II. Materiales biológicos	22
III. Extracción de ciclodipéptidos a partir de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 22	
IV. Evaluación de los cambios morfológicos producidos por ciclodipéptidos bacterianos en células sanas mediante microscopía.	23
V. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT	23
VI. Detección de producción de especies reactivas de oxígeno.	24
VII. Evaluación de muerte celular por citometría de flujo	24
RESULTADOS	25

I. Los ciclodipéptidos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 no generan cambios morfológicos en células sanas.....	25
II. Los ciclodipéptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 presentan efecto citotóxico en la línea celular K562	27
III. Los ciclodipéptidos bacterianos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno durante las primeras horas de tratamiento	29
IV. Los ciclodipéptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 inducen apoptosis en K562.....	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
CONCLUSIÓN	35
PERSPECTIVAS	36
REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos secundarios del tratamiento contra cáncer (NIH, 2020-2).	10
Tabla 2. Actividades biológicas de ciclodipéptidos bacterianos.	13
Tabla 3. Actividades biológicas referentes al efecto sobre células cancerosas de varios ciclodipéptidos bacterianos.	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genes supresores de tumores y protooncogenes en el desarrollo del cáncer. (Modificado de Brandan et al., 2014)	2
Figura 2 Sellos distintivos de las células cancerosas (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011)	3
Figura 5. Leucemia mieloide crónica (Sociedad americana del Cáncer, 2019)	4
Figura 6. Formación del cromosoma Filadelfia. (NIH, s/f).....	5
Figura 3. Número estimado de nuevos casos en México, en el 2020, ambos sexos, grupo de edades de 0 a 29 años (OMS, 2020).....	6
Figura 4. Pacientes con leucemia mayores de 45 años, ambos sexos. (OMS, 2020) A. Número estimado de casos nuevos en 2020. B. Número estimado de muertes en 2020.	8
Figura 7. Estructura base de los ciclodipeptidos (Hernández-Padilla, 2017).	12
Figura 8. Número estimado de nuevos casos de leucemia en 2020 en México, todas las edades (OMS, 2020).....	17
Figura 9. Principales tipos de cáncer alrededor del mundo en 2020, ambos sexos, todas las edades. Barras azules indican incidencia y barras rojas indican mortalidad. (OMS, 2020)	18
Figura 10. Cambios morfológicos en sangre total después de tratamientos de CDPs. Micrografía (100x) tomada de una muestra de sangre total.	25
Figura 11. Ensayo de viabilidad celular MTT en K562 al aplicar ciclodipeptidos de Pseudomonas aeruginosa PAO1.	27
Figura 14. Gráficas de puntos de la producción de especies reactivas de oxígeno.	29
Figura 15. Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno.	30
Figura 12. Gráficas de puntos del ensayo de muerte celular.....	31
Figura 13. Resultados del ensayo del tipo de muerte celular.	32

LISTA DE SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

Ciclodipéptidos	CDPs
Target de Rapamicina	TOR
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Proteína cinasa activada por mitógenos	MAKP
Suero fetal bovino	SFB
Revoluciones por minuto	rpm
Buffer fosfato salino	PBS
Potencial de membrana mitocondrial	$\Delta\Psi_m$
Dosis Letal 50	LD ₅₀
Ioduro de Propidio	IP
Mitad de la concentración máxima eficaz	EC ₅₀
Concentración media inhibitoria	IC ₅₀
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol	MTT
Dihidroetidio	DHE

ÁREA EN LA QUE SE PARTICIPÓ

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría y supervisión del DC. Jesús Campos García. El proyecto fue financiado por CONACYT.

MARCO TEÓRICO

I. Cáncer

La OMS define el término “Cáncer” como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células (OMS, 2020). El Instituto Nacional del Cáncer especifica cáncer como el nombre de las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos (NIH, 2020).

Entonces, “Cáncer” es el término general para referirse a más de 100 enfermedades que afectan distintos tipos de tejidos y tipos de células (Hoskin y Ramamoorthy, 2008). Algunos tipos de cáncer forman aglomeraciones de células cancerosas llamados tumores.

Este tipo de enfermedades son padecimientos multifactoriales. Los factores de riesgo de cáncer incluyen la exposición a productos químicos y factores como la edad y los antecedentes familiares. Algunos ejemplos de éstos son: alcohol, la edad, agentes infecciosos, radiación solar, el tabaco, entre otras (NIH, 2015-4). Cada paciente presenta una combinación única de mutaciones que desarrolla la enfermedad.

i. Características del cáncer

Todas las formas de cáncer se caracterizan por el crecimiento celular anormal resultado por un número relativamente pequeño de mutaciones genéticas heredadas o inducidas por factores ambientales (Hoskin y Ramamoorthy, 2008). Estas mutaciones generan cambios en las vías de señalización que regulan la progresión a través del ciclo y el crecimiento celulares, y estas vías afectadas influyen en otras propiedades biológicas celulares como la supervivencia celular y el metabolismo energético.

Entonces así, la transformación maligna de una célula acontece por acumulación de mutaciones en genes específicos agrupados en dos familias (figura 1):

- La primera familia está integrada por los protooncogenes. Éstos dirigen la producción de proteínas clave en la proliferación y diferenciación celular, como ciclinas, factores de crecimiento, receptores, etc. Cuando éstos mutan se transforman en oncogenes, siendo capaces de orquestar la multiplicación desordenada de las células, de modo que algunos de ellos potencian la maquinaria celular para que sintetice de forma masiva determinados desencadenantes de la división descontrolada.
- La segunda familia está integrada por los genes supresores de tumores también conocidos como genes supresores, que en el organismo sano controlan la proliferación celular. Ellos, por tanto, son reguladores negativos de crecimiento y cuando no están presentes en la célula o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células dejan de crecer normalmente y

adquieren propiedades proliferativas anormales, características de las células tumorales (Brandan *et al.*, 2014).

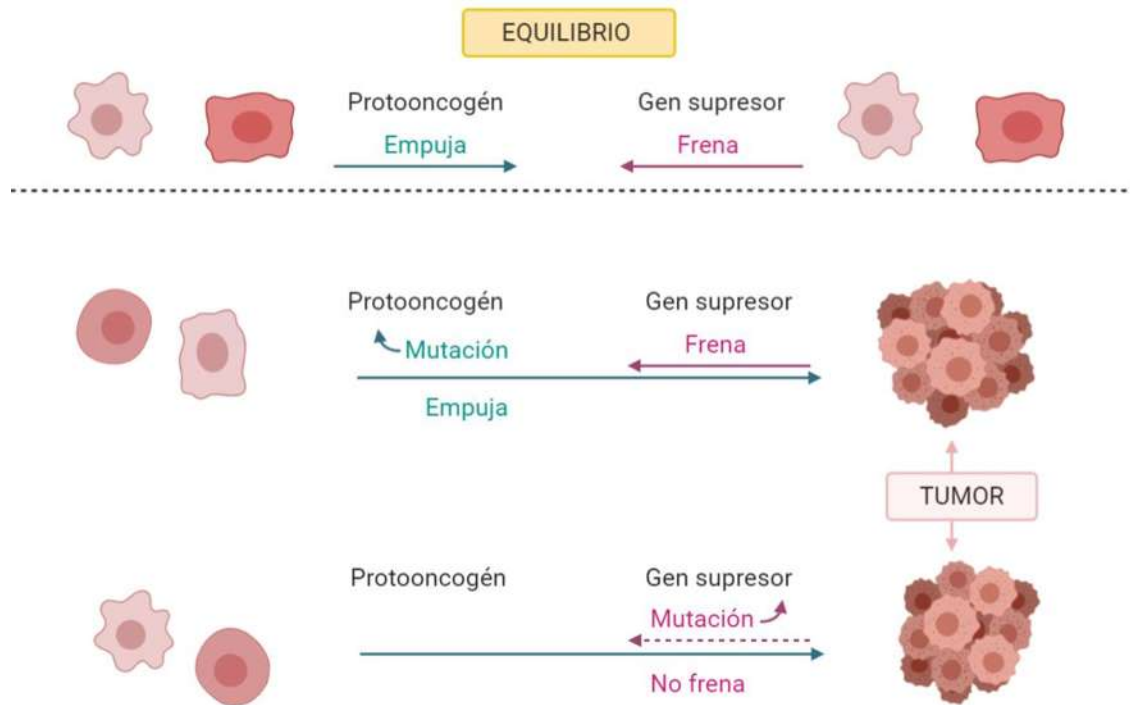


Figura 1. Genes supresores de tumores y protooncogenes en el desarrollo del cáncer. (Modificado de Brandan *et al.*, 2014)

Un desequilibrio en la expresión de estos grupos de genes da como resultado diversas características que le permiten a las células cancerosas dividirse descomedidamente y resistir a la muerte celular (Weinberg, 1989).

Hanahan y Weinberg propusieron en 2011 que una célula para denominarse como “célula cancerosa” debe de cumplir con una lista de sellos distintivos. La base de su estudio fue el cambio progresivo de una célula normal a un estado neoplásico y las características que va adquiriendo. Estas características distintivas permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica.

Las características mencionadas son: la capacidad de mantener activas las vías de señalización referentes a procesos de proliferación, evasión de los supresores de crecimiento, activación del proceso de invasión y metástasis, habilitación de una inmortalidad replicativa, inducción del proceso de angiogénesis, resistencia a la muerte celular, inestabilidad genómica y desregulación de los procesos energéticos celulares. También incluyen el proceso de evasión de la destrucción por el sistema inmune y la promoción del proceso de inflamación. Cada uno de estos cambios fisiológicos representa un mecanismo de defensa exitoso para el desarrollo del cáncer (figura 2).

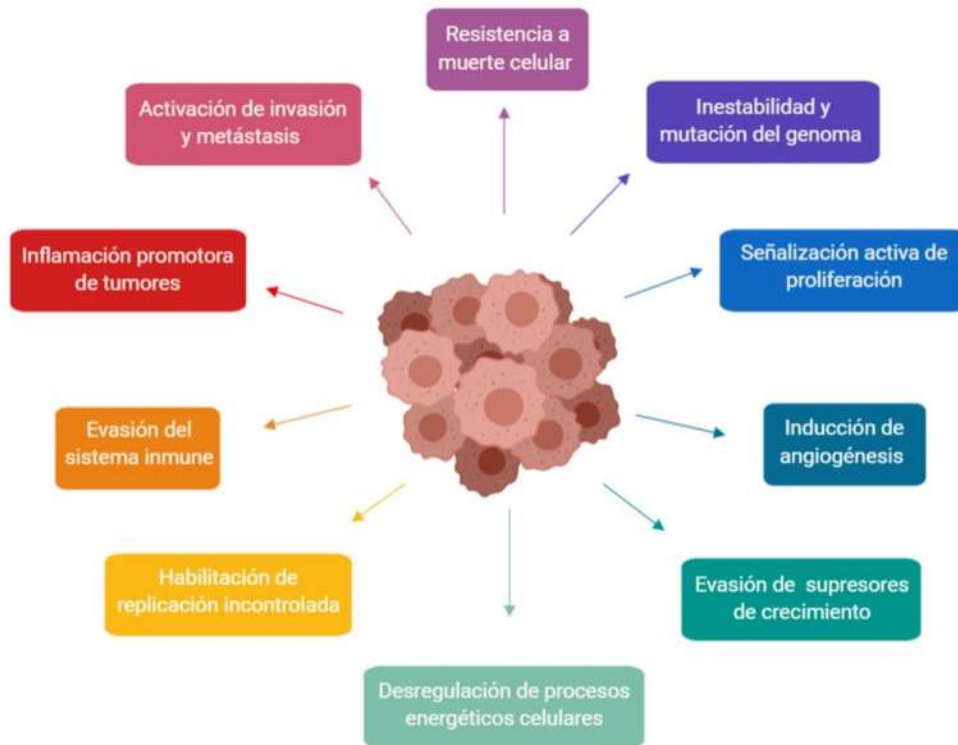


Figura 2 Sellos distintivos de las células cancerosas (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011)

Existen dos tipos de cáncer clasificados con base en el desarrollo de la enfermedad; los que desarrollan tumores sólidos y los que no los desarrollan. Los tumores son masas inusuales conformadas por células dañadas, principalmente; pero más que eso, son complejos de tejidos compuestos por distintos tipos de células. Además, participan interacciones en donde las células cancerosas “influyen” en las células normales y en los vasos sanguíneos que rodean y alimentan las células del tumor desarrollando un microambiente dentro de estos (Hanahan y Weinberg, 2011; NIH, 2015).

En comparación, las neoplasias malignas hematológicas, como las leucemias y linfomas, no forman tumores sólidos. En lugar de eso, estos desordenes presentan un incremento de leucocitos en sangre y/o médula ósea (Juliussen y Hough, 2016).

II. Leucemia

“Leucemia” es el nombre común para varios desórdenes malignos que presentan un incremento y alteración en la diferenciación de células blancas (Juliussen y Hough, 2016; Rafieemehr *et al.*, 2019). Estas enfermedades no generan tumores sólidos, en lugar de eso, un gran número de leucocitos anormales se acumulan en el organismo, y desplazan a los glóbulos funcionales. Algunas de las repercusiones que producen la concentración baja de células sanas en sangre son problemas con el transporte de oxígeno a distintos tejidos en el cuerpo, dificultad para controlar las

hemorragias y que el sistema inmune no funcione de manera adecuada para combatir infecciones, entre otras (NIH, 2020-2).

i. Tipos de leucemia

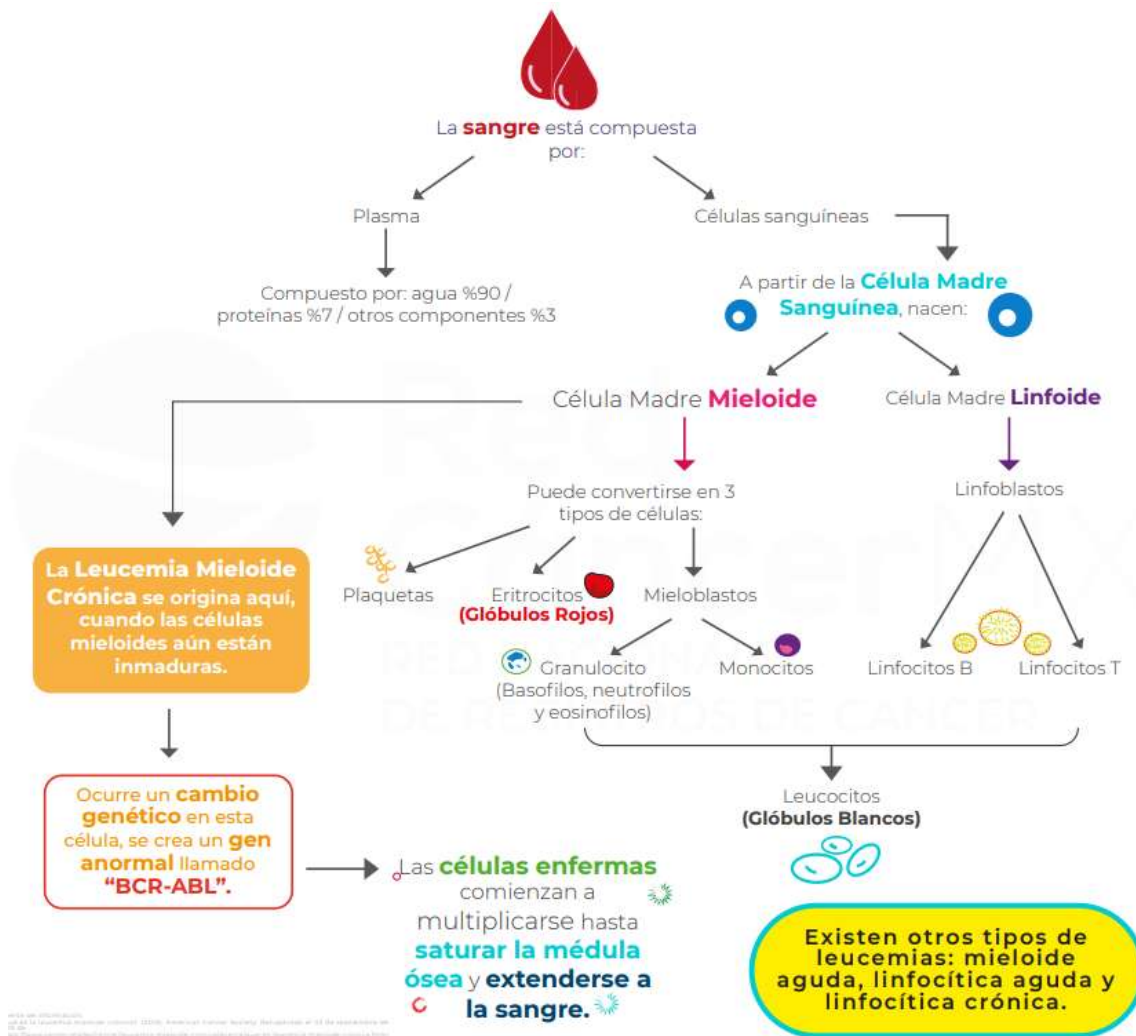


Figura 3. Leucemia mieloide crónica (Sociedad americana del Cáncer, 2019)

Existen varios tipos de leucemia. La clasificación depende del tipo de célula sanguínea mutada, y de la velocidad de su crecimiento y desarrollo.

Basado en el tipo de células (linfóide o mieloide), así como en el curso de la enfermedad, las leucemias se dividen en agudas, las cuáles incluye leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda, y en crónicas, refiriéndose a la leucemia mieloide crónica y la leucemia linfoblástica crónica (NIH, 2020; Rafieemehr *et al.*, 2019).

La leucemia mieloide es un desorden mieloproliferativo resultado de la transformación neoplásica de una célula madre primitiva hematopoyética, afectando el linaje mieloide. Se origina en la médula ósea y, como ya se mencionó con anterioridad, se puede clasificar en aguda y crónica. En particular, este tipo de leucemia afecta principalmente a pacientes mayores de 60 años. (Flores, 2018).

La leucemia mieloide crónica (figura 5) es una neoplasia mieloproliferativa crónica, originada en la célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas. Presenta habitualmente el cromosoma Filadelfia o el reordenamiento del gen BCR-ABL (figura 6), reflejo de una traslocación recíproca entre los cromosomas 9q34 y 22q11. El gen de fusión BCR-ABL es el responsable de la patogénesis de la enfermedad y su actividad tirosina quinasa, constitutivamente aumentada, es esencial en la capacidad de la transformación hematopoyética leucémica (Flores, 2018; Romero, 2020). El gen híbrido puede aparecer a cualquier edad, pero raramente en infantes (Juliusson y Hough, 2016).

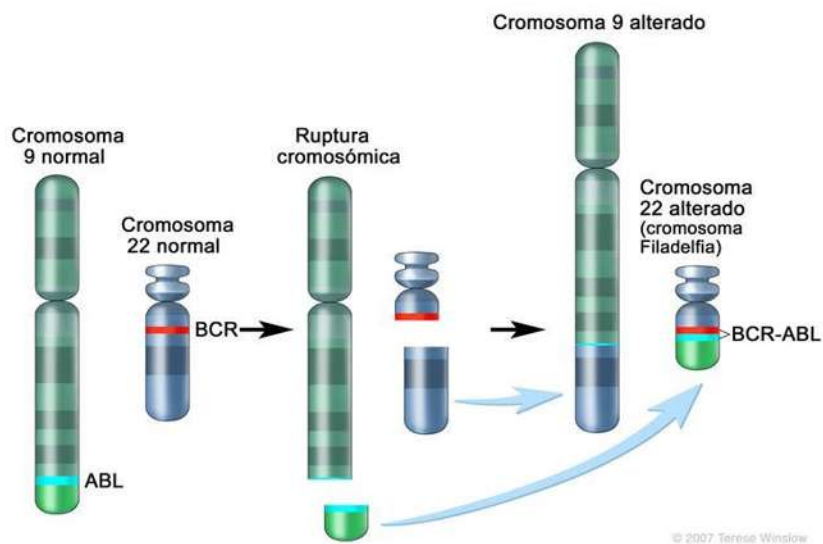


Figura 4. Formación del cromosoma Filadelfia. (

El nuevo rearrreglo en el cromosoma Filadelfia provoca la expresión de una oncoproteína de fusión BCR-ABL, la cual es una cinasa de tirosinas activa que promueve el crecimiento y replicación, y señales apoptóticas aberrantes.

La leucemia mieloide crónica tiene 3 diferentes fases de desarrollo: crónica, acelerada y blástica. La fase crónica es en un 50% asintomática y puede durar de 3-5 años; la fase acelerada es una fase transitoria en donde se manifiestan síntomas como fatiga, pérdida de peso, crecimiento del bazo y aparición de células blásticas (células inmaduras y disfuncionales) en la sangre; y la fase blástica tiene síntomas como pérdida de peso, fiebre, dolores de huesos, anemia, complicaciones con

infecciones y hemorragias, así mismo una mayor infiltración de células inmaduras de tipo blástico en sangre y otros órganos (Flores, 2018).

Existen varios trabajos en los cuales intentan estudiar y comprobar el efecto citotóxico de distintas sustancias para atacar la leucemia mieloide crónica. La mayoría de los grupos de estudio utilizan como modelo de estudio la línea celular K562. Los blastos K562 fueron derivados de una paciente con leucemia mieloide crónica; éstos son células hematopoyéticas multipotenciales malignas (Klein, *et al.*, 1976).

ii. Incidencia de leucemia en México

Las leucemias pueden presentarse a cualquier edad, desde recién nacidos hasta personas de edad avanzada, pero los diferentes tipos de cáncer tienen una distribución diferente en la población. La leucemia aguda linfoblástica es más común en niñez temprana pero muy rara en adultos, mientras que la leucemia mieloide aguda es menos común en niños, pero es cada vez más común en adultos mayores. (Juliusson y Hough, 2016).

Número estimado de nuevos casos en 2020, en México, ambos sexos, edades de 0 a 29 años.

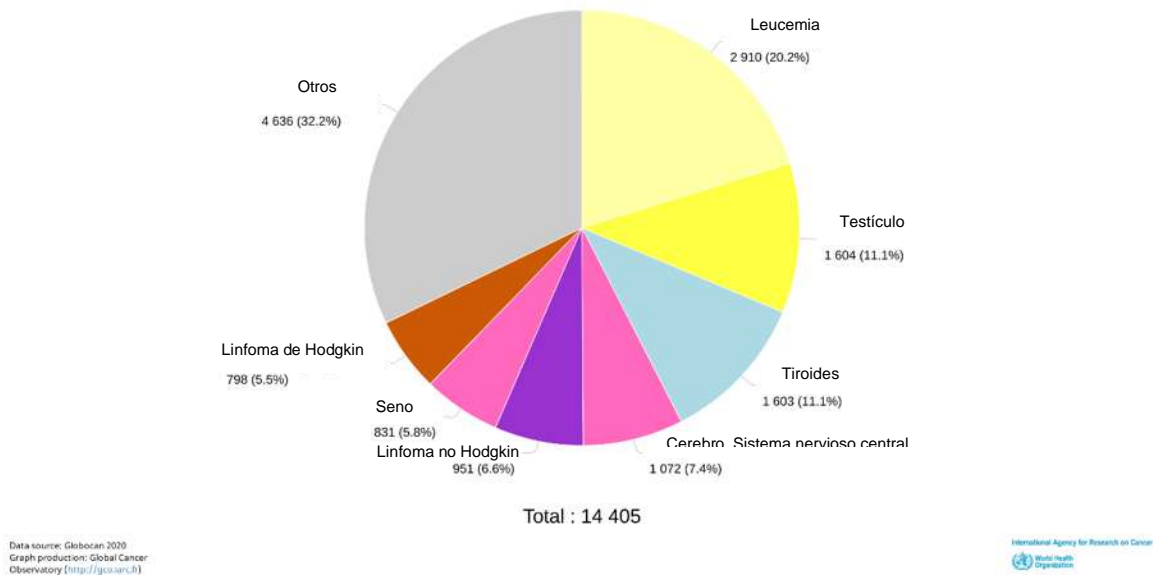


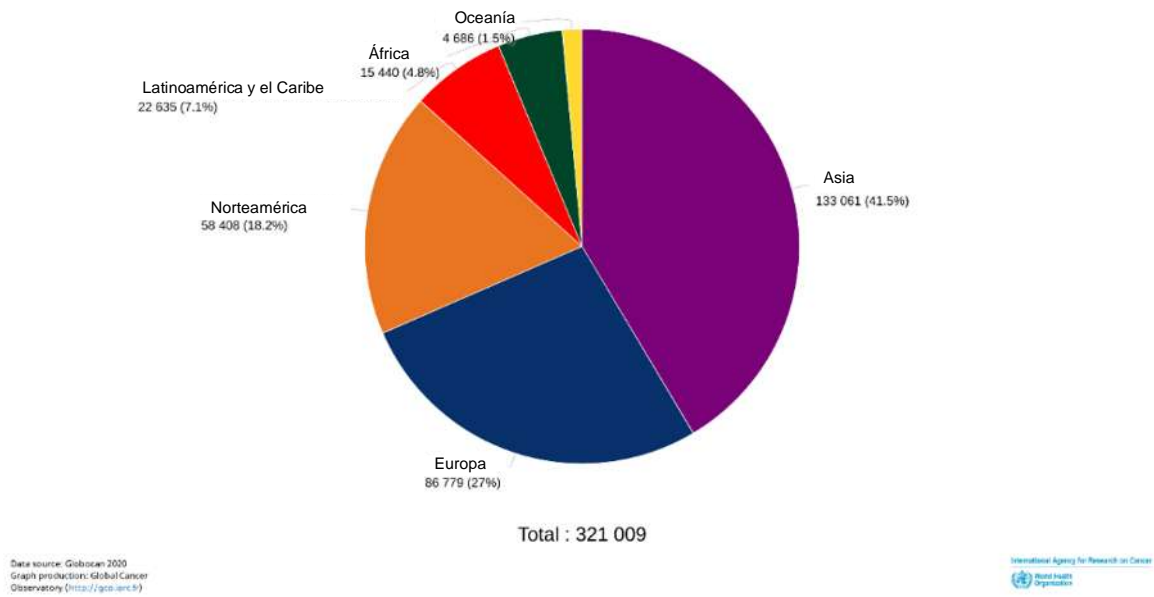
Figura 5. Número estimado de nuevos casos en México, en el 2020, ambos sexos, grupo de edades de 0 a 29 años (OMS, 2020).

En la figura 3 se muestran los casos nuevos registrados en el 2020 en México, excluyendo a los pacientes de 30 años y más (OMS, 2020). Como se muestra, la

leucemia es el tipo de cáncer con mayor incidencia con casi 3000 casos nuevos, catalogando así a la leucemia como el cáncer más común en esta población (NIH, 2020-2).

La leucemia es un problema de salud alrededor del mundo, afectando también a los adultos mayores. En el 2020, se registraron 321,009 casos nuevos en pacientes mayores de 45 años (figura 4). Se puede observar que en el mismo año se registraron más de 230 mil muertes en el mismo sector de la población.

A. Número estimado de casos nuevos en 2020, leucemia, ambos sexos, edades mayores a 45 años.



B. Número estimado de muertes en 2020, leucemia, ambos sexos, edades mayores a 45 años.

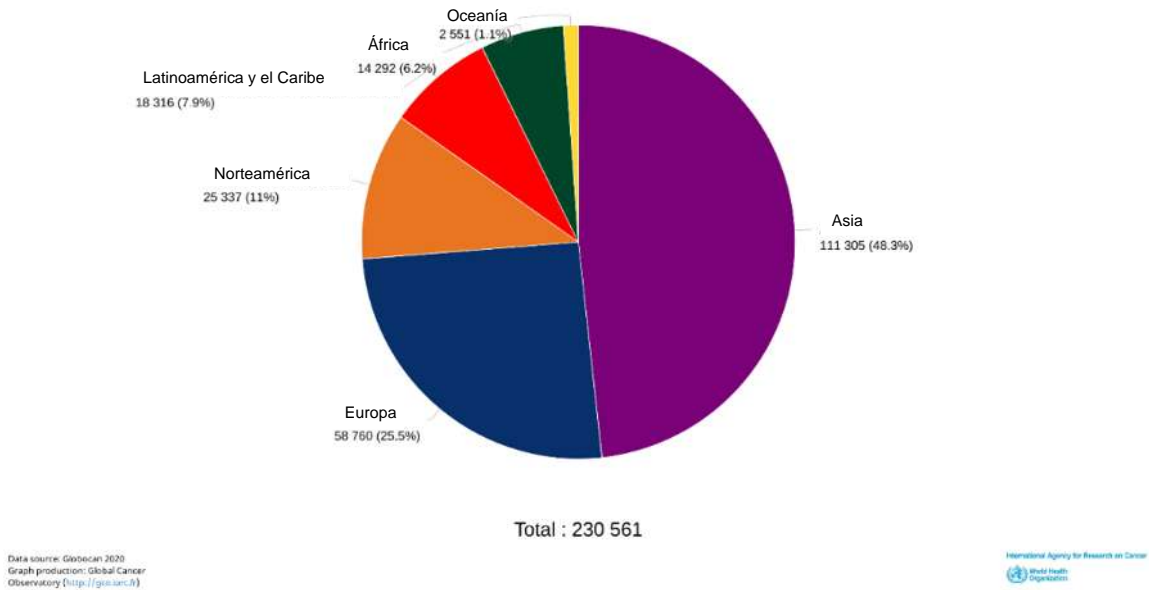


Figura 6. Pacientes con leucemia mayores de 45 años, ambos sexos. (OMS, 2020)
 A. Número estimado de casos nuevos en 2020. B. Número estimado de muertes en 2020.

iii. Tratamientos contra la leucemia

Las leucemias difieren ampliamente en cuanto al pronóstico, la necesidad de tratamiento y la intensidad del tratamiento (Whiteside, 1979). La elección del tratamiento más adecuado depende de muchos factores como la edad y la salud general del paciente, el tipo de leucemia que se padece y/o si se ha extendido a otras partes del cuerpo.

Los tratamientos frecuentes que se usan para combatir la leucemia son:

Quimioterapia. La quimioterapia es el uso de medicamentos para eliminar las células cancerosas. Pueden administrarse estos medicamentos vía oral o vía intravenosa. Este método es la principal forma de tratamiento para la leucemia. (NIH, 2015-2).

Terapia biológica. La terapia biológica funciona mediante tratamientos que ayudan al sistema inmunitario a reconocer y atacar las células leucémicas. Este tipo de tratamiento implica el uso de organismos vivos, sustancias procedentes de organismos vivos o versiones producidas en el laboratorio de tales sustancias para tratar enfermedades. Algunas terapias biológicas para el cáncer estimulan el sistema inmunitario del cuerpo para que actúe contra las células cancerosas. Estos tipos de terapia biológica, los cuales algunas veces se llaman colectivamente "inmunoterapia" no atacan directamente a las células cancerosas. Otras terapias biológicas, como los anticuerpos, sí atacan directamente a células cancerosas. Las terapias biológicas que interfieren con moléculas específicas que participan en el crecimiento y evolución de tumores se llaman también terapias dirigidas (NIH, 2018-3).

Terapia dirigida. Este tratamiento es la base de la medicina de precisión. Se trata de un tipo de tratamiento del cáncer que actúa sobre los cambios en las células cancerosas que les ayuda a crecer, a dividirse y a diseminarse.

Los tipos de medicamentos que se utilizan en este caso son:

- Los medicamentos de moléculas pequeñas que son capaces de entrar fácilmente en las células debido a su tamaño y por ello se usan para que actúen sobre el objetivo o blanco del tratamiento que está en el interior de las células.
- Los anticuerpos monoclonales, también conocidos como anticuerpos terapéuticos, que son proteínas producidas en laboratorio, diseñadas para que se adhieran a blancos específicos que se encuentran en las células cancerosas. Algunos anticuerpos monoclonales marcan a las células cancerosas para que las detecte con mayor facilidad el sistema inmune y las destruya. Otros anticuerpos monoclonales detienen directamente el crecimiento de las células cancerosas o hacen que se autodestruyan.

La terapia dirigida puede afectar al cáncer de diferentes maneras como: ayudar al sistema inmunitario a destruir, detener el crecimiento o llevar sustancias tóxicas a

las células dañadas, causar la muerte de estas células o evitar que el cáncer reciba las hormonas que necesita para crecer, entre otras (NIH, 2018).

Radioterapia. Es un tratamiento que usa radiación de alta energía para dañar el DNA de las células de leucemia y con esto, detener su crecimiento y destruirlas. Se puede recibir radiación en una zona específica del cuerpo donde haya una acumulación de células dañadas, o recibir radiación en todo el cuerpo.

Existen dos tipos principales de radioterapia:

- a) Radioterapia de haz externo: es un tipo de tratamiento local, en donde se trata la parte del cuerpo afectada y no en su totalidad.
- b) Radioterapia interna: es un tratamiento en el que la fuente de radiación (sólida o líquida) se pone dentro de su cuerpo.

(NIH, 2019)

Trasplante de células madre. Un trasplante de células madre es un procedimiento para reemplazar la médula ósea enferma por médula ósea sana. Antes de un trasplante de células madre, se administran dosis altas de quimioterapia o de radioterapia para destruir la médula ósea enferma. Luego, se inyecta una infusión de células madre para reconstruir la médula ósea (NIH, 2015-3).

a) Efectos secundarios de los tratamientos

Los efectos secundarios ocurren cuando el tratamiento contra la leucemia afecta tejidos u órganos sanos (NIH, 2020-2).

La Sociedad Americana del Cáncer describe alrededor de 34 efectos secundarios comunes relacionados con los tratamientos contra el cáncer; éstos se enlistan en la tabla 1. Algunos pueden ser graves, pero suelen desaparecer una vez finalizado el tratamiento; sin embargo, existen algunos efectos a largo plazo que pueden llegar a durar hasta años después de terminado el tratamiento.

Tabla 1. Efectos secundarios del tratamiento contra cáncer (NIH, 2020-2).

EFFECTOS SECUNDARIOS DEL TRATEMIENTO CONTRA EL CÁNCER

Alopecia	Inflamación
Anemia	Linfedema
Cambios en la piel y en las uñas	Náuseas y vómitos
Delirio	Problemas de fertilidad
Diarrea	Problemas de los nervios
Dolor	Problemas de memoria y concentración
Edema	Problemas para dormir
Estreñimiento	Problemas urinarios y de vejiga
Falta de apetito	Sangrado y moretones
Fatiga	Síntomas pseudogripales
Infección y neutropenia	Úlceras bucales

b) Búsqueda de alternativas de tratamientos

Los tratamientos aplicados en la actualidad para tratar el cáncer pueden ser efectivos ya que suelen obtenerse resultados favorables estableciendo una terapia diseñada para cada paciente. Sin embargo, estos tratamientos presentan efectos adversos dañando tejidos sanos. Por esta razón, se busca un fármaco ideal que elimine las células cancerosas sin afectar el resto de las células. Por falta de estos medicamentos, y por el continuo estudio y elucidación de mecanismos que participan en el desarrollo y progresión de la enfermedad, la búsqueda de alternativas para terapias contra el cáncer se volvió una necesidad.

La apoptosis es una manera controlada de eliminar las células cancerosas. La apoptosis es un tipo de muerte que, en una etapa temprana, las células se agrupan perdiendo el contacto con células vecinas y reducen su tamaño. En el citoplasma, el retículo endoplásmico se dilata y las cisternas se hinchan para formar vesículas y vacuolas. En el núcleo, la cromatina se condensa y se fragmenta por acción de las endonucleasas. La membrana plasmática se enrevesa y las uniones celulares se desintegran. La célula se disocia en varias esferas de membrana denominados cuerpos apoptóticos que contienen el material citoplasmático y estos cuerpos después son reconocidos por células fagocíticas. Dado que los cuerpos apoptóticos están rodeados por una membrana plasmática intacta, la apoptosis se produce sin fugas de contenido celular y sin inflamación (Lawen, 2003). Existe una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto a nivel fisiológico como patológico, que pueden desencadenar la apoptosis (Kerr, 2002), como por ejemplo el desequilibrio oxidativo de las células.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos químicamente reactivos del metabolismo aeróbico normal y la exposición xenobiótica. Las ROS producidas durante diferentes reacciones celulares puede ser beneficiosa o dañina para las células. A concentraciones fisiológicas, las ROS funcionan como segundos mensajeros en la señalización intracelular. Por otro lado, la aberración en el balance redox que conduce a una producción excesiva de ROS puede provocar alteraciones bioquímicas e inducir la modificación oxidativa de las macromoléculas celulares conduciendo a muerte celular. La apoptosis (o muerte celular programada) es un proceso fisiológico bien regulado involucrado en la regulación de la homeostasis tisular. La inducción de la apoptosis por señales extracelulares e intracelulares desencadena dos vías de señalización diferentes. Las vías apoptóticas son la vía por receptores de muertes o extrínseca y la vía mitocondrial o intrínseca. El estado redox de la célula desempeña un papel importante en la regulación de la apoptosis en respuesta a cualquier estímulo externo o interno. Las ROS pueden mediar la apoptosis regulando la expresión de varias proteínas proapoptóticas como caspasas o proteínas antiapoptóticas como linfoma-2 de células B (Bcl-2) y proteína celular inhibitoria de la FLICE (c-FLIP). La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas y la apoptosis desregulada se asocia con varias patologías incluyendo el cáncer (Azad, 2014).

Recientemente, las terapias contra el cáncer que inducen estrés oxidativo mediante el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o inhibiendo procesos antioxidantes han recibido atención (Kim, 2019). Varios estudios han demostrado la capacidad de las ROS para infligir daños celulares graves y causar muerte celular y así destruir células cancerosas (Hao *et al.*, 2020).

Muchos grupos de investigación alrededor del mundo se dedican a probar diversas sustancias con habilidades citotóxicas con el propósito de descubrir nuevas alternativas de tratamiento que sean más específicas, selectivas y, por ende, que representen menores efectos secundarios. Una alternativa llamativa es el uso de ciclodipéptidos de origen bacteriano.

III. Ciclodipéptidos bacterianos

Los ciclodipeptidos (CDPs), también llamados 2,5-diketopiperazinas constituyen una clase de moléculas pequeñas derivadas de la condensación de dos aminoácidos principalmente sintetizados por microorganismos (Ortiz *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2017). La capacidad de los microorganismos para producir los ciclodipéptidos está muy extendida y los datos publicados han demostrado que aproximadamente el 90% de las bacterias gramnegativas los producen. Las CDP sintetasas (CDPSs) y las péptido sintetasas no ribosomales (NRPSs) catalizan la biosíntesis de la estructura base de los CDPs, la cuál es después modificada por enzimas adaptadoras asociadas a las agrupaciones de genes biosintéticos de CDPs (Mishra *et al.*, 2017).

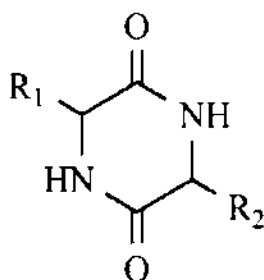


Figura 7. Estructura base de los ciclodipéptidos (Hernández-Padilla, 2017).

Los CDPs se pueden configurar como isoformas *cis* y *trans*, pero las configuraciones *cis* son predominantes. Varias modificaciones de aminoácidos confieren diversas funciones químicas y biológicas. Los CDPs exhiben una mejor actividad biológica que sus contrapartes lineales debido a su mayor estabilidad, resistencia a las proteasas y rigidez conformacional, todos factores que aumentan su capacidad de interactuar específicamente con objetivos biológicos.

Los datos disponibles indican que aproximadamente el 90% de los productores de CDPs son bacterianos (Mishra *et al.*, 2017). Gracias a su estructura base (figura 7),

los ciclodipéptidos son capaces de interactuar con blancos moleculares de las células debido a sus grupos aceptores y donadores de los enlaces hidrógeno, por lo que a los CDPs y sus derivados se les atribuye una amplia gama de actividades biológicas (Mishra et al., 2017; Carvalho y Abraham, 2012).

a) Aplicaciones biológicas de los ciclodipéptidos bacterianos

Debido a su rígida estructura cíclica, los CDPs, a diferencia de sus contrapartes lineales, pueden soportar la degradación enzimática, y esto ha impulsado aún más el desarrollo de sistemas basados en CDPs para aplicaciones biomédicas. En química medicinal, los CDPs se consideran andamios prometedores para el diseño de una variedad de compuestos activos para diversas funciones biológicas debido a la versatilidad asociada con la funcionalización del CDP. Estos compuestos exhiben diversos y notables efectos biológicos, tales como actividad antibacteriana, antitumoral, antimicótica, y antiviral (Mishra et al., 2017).

Algunos efectos biológicos reportados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Actividades biológicas de ciclodipéptidos bacterianos.

Ciclodipéptido	Actividad biológica	Referencia
Ciclo (L-Val-L-Tyr) y Ciclo (L-Val-L-Phe) de <i>Staphylococcus aureus</i>	Factor de virulencia bacteriano	Morgan et al., 2010
Ciclo(L-Phe-L-Pro) de <i>Psychrobacter sp.</i>	Presentan citotoxicidad en células epiteliales intestinales de humano	Li et al., 2008
Ciclo (L-Ile-L-Val) y Ciclo (L-Phe-L-Pro) de <i>Propionibacterium sp.</i>	Actividad antifúngica	Lind et al., 2007
Ciclo (L-Phe-L-Pro) y Ciclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) de <i>Lactobacillus plantarum</i>	Actividad antifúngica	Ström et al., 2002
Ciclo (Pro-Tyr) de por <i>Alternaria alternata</i>	Causa lesiones necróticas en las hojas de <i>Centaurea maculosa</i>	Park et al., 1994
Ciclo (L-Pro-L-Tyr), Ciclo (L-Pro-L-Phe) y Ciclo (L-Pro-L-Val) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Actividad promotora del crecimiento vegetal de <i>A. thaliana</i>	Ortiz et al., 2011

b) **Ciclodipéptidos bacterianos como alternativa de tratamiento contra el cáncer**
 Además de las actividades ya mencionadas, algunos CDPs presentan una actividad biológica sobre diferentes líneas celulares de cáncer (Tabla 3):

Tabla 3. Actividades biológicas referentes al efecto sobre células cancerosas de varios ciclodipéptidos bacterianos.

Ciclodipéptido	Actividad biológica	Referencia
Ciclo (Phe-Pro), ciclo (Tyr-Pro) y ciclo (Trp-Trp)	Incrementan la expresión de marcadores bioquímicos retardando el crecimiento de células de carcinoma de colon (HT-29)	Milne <i>et al.</i> , 1998
ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Phe) aislado de especies de <i>Bacillus</i>	Inducen la disminución en la fosforilación de la quinasa de serin-treonina (AKT1)	Hong <i>et al.</i> , 2008
	Presentan efecto citotóxico en las líneas HeLa y CaCo-2	Vázquez <i>et al.</i> , 2015
Ciclo (L-Pro-L-Tyr), Ciclo (L-Pro-L-Phe) y Ciclo (L-Pro-L-Val) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inducen apoptosis, teniendo efecto sobre la vía de señalización PI3K/mTOR/Akt/S6K en línea celular HeLa	Hernández <i>et al.</i> , 2017
	Inhiben el crecimiento tumoral de melanoma en modelo murino	Duran <i>et al.</i> , 2020

La evaluación de los CDPs como potenciales agentes anticancerosos es un campo de estudio prometedor. En el presente proyecto se evaluará el efecto de la mezcla de los ciclodipéptidos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre la línea K562, referente a leucemia mieloide crónica.

ANTECEDENTES

En el 2015, Vázquez *et al.* estudiaron el efecto citotóxico de los CDPs producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ciclo (L-Pro-L-Tyr), ciclo (L-Pro-L-Val) y ciclo (L-Pro-L-Phe) en líneas celulares de adenocarcinoma cervical HeLa y adenocarcinoma colorrectal CaCo-2. Los resultados demostraron que la mezcla de CDPs promueve la muerte celular en ambas líneas celulares de manera dosis dependiente, con una concentración inhibitoria del 50% (IC50) de 0.53 y 0.66 mg/mL, para células HeLa y CaCo-2, respectivamente. En este trabajo también se demostró que las células cancerosas muestran características apoptóticas cuando son tratadas con la mezcla de CDPs a una concentración <0.001 mg/mL. Los valores de IC50 para células apoptóticas en HeLa y CaCo-2 fueron 6.5×10^{-5} y 1.8×10^{-4} mg/mL, respectivamente.

Por su parte Hernández *et al.*, demostraron en el 2017 que los CDPs de PAO1, tanto individuales como en mezcla, inhiben la proliferación de células HeLa, deteniendo el ciclo celular en la transición de G0 – G1. La mezcla cruda de CDPs promovió la muerte celular de una manera dosis dependiente, mostrando eficacia similar a los ciclodipéptidos aislados e induciendo apoptosis con una concentración media de la eficacia máxima (EC50) entre 0.6 y 3 μ M. Además, los CDPs mostraron actividad proapoptótica más alta que sus análogos sintéticos. Subsecuentemente, los CDPs afectaron el potencial de membrana mitocondrial e indujeron apoptosis mediante la vía dependiente de la caspasa 9. El mecanismo de inhibición de la proliferación celular de HeLa por los CDPs de PAO1 involucra la inhibición de la fosforilación de las proteín-cinasas Akt-S473 y S6k-T389, mostrando un comportamiento cíclico de sus expresiones y fosforilaciones con una tendencia dependiente del tiempo y concentración. Este trabajo demostró que la vía de señalización Pi3K-Akt-mTOR-S6k está involucrada en el efecto antiproliferativo de los ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* PAO1.

En el 2020, Durán *et al.* mostraron que los CDPs decrecieron el tamaño de melanoma y la formación de tumor en modelo de ratón con melanoma xenoinjertado de manera subcutánea. En tumores, los CDPs causaron fragmentación nuclear y cambiaron la expresión de los marcadores Bcl-2 y Ki67 y promovieron la restauración de la hiperactivación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Adicionalmente, elementos de diversas vías de señalización, como Ras-ERK, PI3K/JNK/PKA, p27Kip1/CDK1/survivin, MAPK, HIF-1, transición epitelio-mesenquimal y vías de células madre cancerosas fueron modificadas por el tratamiento de melanoma murino xenoinjertado con los CDPs. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que las múltiples vías de señalización involucradas en la agresividad de la línea de melanoma murino B16-F0 son dianas de los CDPs bacterianos. El modelado molecular de los CDPs con las proteín-cinasas involucradas en procesos neoplásicos sugieren que estos compuestos pueden estar interactuando con los sitios activos de las enzimas, interfiriendo con múltiples vías involucradas con la formación y progresión tumoral.

También en el 2020, Hernández *et al.* continuaron con su proyecto de investigación con el propósito de esclarecer las vías de señalización involucradas en el efecto antiproliferativo de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en la línea celular HeLa. Los resultados mostraron que el efecto antiproliferativo de los CDPs ocurre mediante el bloqueo de la vía de PI3K/Akt/mTOR, inhibiendo a los complejos mTORC1/mTORC2 de una manera dependiente de TSC1/TSC2. Además, los CDPs bloquearon las proteín-cinasas de múltiples vías de señalización involucradas en la supervivencia, proliferación, invasión, apoptosis, autofagia y metabolismo energético, como PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK1/2, PI3K/JNK/PKA, p27Kip1/CDK1/survivin, MAPK, HIK-1 Wnt/ β -catenin, HSP27, EMT, CSCs, y receptores como EGF/ErbB2/HGF/Met.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer, en sus diferentes localizaciones y variantes, es un importante problema de salud pública a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte.

En el año 2020, en México se registraron alrededor de 190 mil casos nuevos. Este número representa el 1.1% del total de los casos registrados a nivel mundial ese año (OMS, 2020).

Número estimado de nuevos casos en 2020, en México, todos los tipos de cáncer, ambos sexos, todas las edades

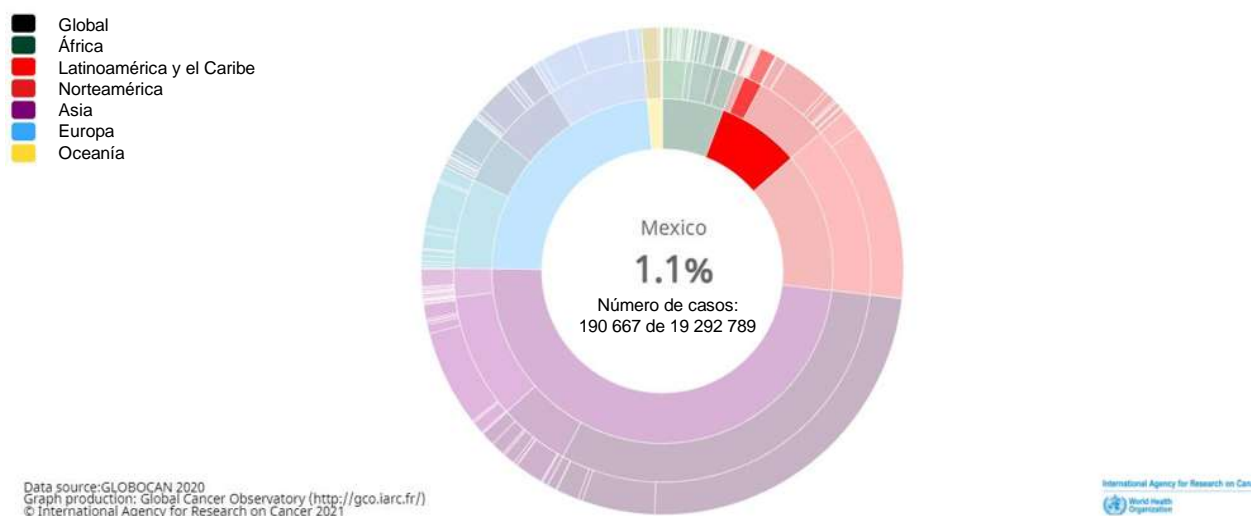


Figura 8. Número estimado de nuevos casos de leucemia en 2020 en México, todas las edades (OMS, 2020).

La leucemia se incluye dentro de los principales tipos de cáncer causantes de muertes alrededor del mundo (figura 9).

En países subdesarrollados (categoría en la cual se encuentra México), existen grandes problemas para tratar esta enfermedad. Alrededor del 80% de los casos son detectados en estadios avanzados de la enfermedad, en los cuales el tratamiento es de alto costo y de bajo rendimiento. En 2017, solo el 26% de los países de ingresos bajos informaron de que la sanidad pública contaba con servicios de patología para atender a la población en general. Más del 90% de los países de ingresos altos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países de ingresos bajos este porcentaje es inferior al 30% (OMS, 2018). Estos datos demuestran la gravedad del problema de salud que el cáncer puede generar a nivel mundial.

Número estimado de nuevos casos y muertes alrededor del mundo, en 2020, todos los tipos de cáncer, ambos sexos, todas las edades

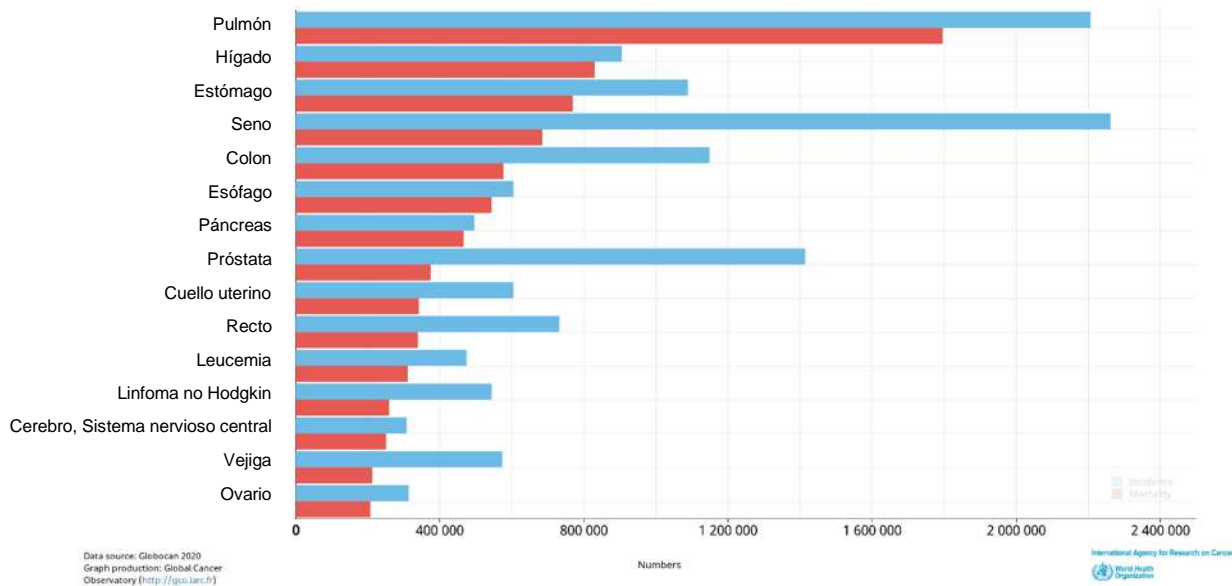


Figura 9. Principales tipos de cáncer alrededor del mundo en 2020, ambos sexos, todas las edades. Barras azules indican incidencia y barras rojas indican mortalidad. (OMS, 2020)

Además, los procedimientos empleados para erradicar el cáncer presentan diferentes limitaciones ya que muestran bajos índices terapéuticos, altamente tóxicos y presentan un amplio espectro de efectos secundarios (OMS, 2020). Para solucionar este problema, es indispensable estudiar nuevos fármacos con el propósito de eliminar los efectos adversos.

El equipo de trabajo del laboratorio de Biotecnología microbiana ha comprobado que los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 presentan citotoxicidad en células de HeLa, CaCo2 y B16-F0, inducen apoptosis por la vía intrínseca y reducen el crecimiento tumoral; además, se ha demostrado que no causan daño en células sanas (Vázquez, 2015; Hernández, 2017; Durán, 2020).

El objetivo del presente proyecto fue estudiar el efecto de los ciclodipéptidos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente varios tratamientos contra el cáncer presentan resistencia y efectos secundarios que a largo plazo dañan la salud de los pacientes. Por tanto, el descubrimiento de drogas con alta efectividad y bajos niveles de toxicidad para los métodos antineoplásicos es una tarea urgente y de alta importancia.

La principal característica que tienen que presentar las nuevas propuestas es que éstos activen mecanismos de muerte celular que no provoquen efectos contraproducentes. La apoptosis es el principal mecanismo que se busca estimular ya que tiene ventajas sobre otros tipos de muerte celular como, por ejemplo, no provocar una respuesta inflamatoria. Algunos estudios han reportado que los niveles excesivos de especies reactivas de oxígeno causan estrés oxidativo, destruyendo la homeostasis celular. Se ha demostrado que la alta generación de ROS juega un papel importante en la inducción de apoptosis. Sin embargo, es necesario comprender las rutas de señalización y las dianas moleculares que se encuentren participando en el proceso.

Una de las alternativas a los tratamientos convencionales últimamente estudiadas es el uso de ciclodipéptidos bacterianos. Los ciclodipéptidos bacterianos son moléculas pequeñas constituidas por dos aminoácidos ciclados y unidos. A estas moléculas se les ha atribuido numerosas funciones biológicas.

Se ha demostrado que los ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* PAO1 presentan efecto antiproliferativo e inducen apoptosis en líneas celulares HeLa, Caco-2 y B16F/0, las cuales tienen en común que generan tumores sólidos. Al contrario de estos casos, la leucemia se desarrolla sin producir aglomerados celulares (tumores).

Por lo que es de nuestro interés determinar el efecto de los CDPs en líneas celulares no epiteliales (como la línea celular K562) y estudiar los mecanismos moleculares involucrados.

HIPÓTESIS

Los ciclodipéptidos bacterianos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 tienen efecto citotóxico en la línea celular de leucemia mieloide crónica K562, induciendo apoptosis celular mediante el aumento de especies reactivas de oxígeno.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico de los ciclodipéptidos bacterianos en la línea celular humana de leucemia mieloide crónica K562.

Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 sobre la viabilidad celular de la línea celular humana de leucemia mieloide crónica K562.
2. Examinar la producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular K562 inducida por los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1.
3. Analizar el tipo de muerte inducido por los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en la línea celular humana de leucemia mieloide crónica K562.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

I. Medios de cultivos

Para *Pseudomonas aeruginosa* PAO1:

Caldo Luria-Bertani (Caldo LB). NaCl 5 g/L, peptona de caseína 10 g/L y extracto de levadura 5 g/L. Se utiliza agua destilada.

Ager Luria-Bertani (Agar LB). NaCl 5 g/L, peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y agar bacteriológico 1.5%. Se utiliza agua destilada.

Para la línea celular K562:

Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640. Suero fetal bovino (SFB) 10%, Glucosa 2%, HEPES 1%, Piruvato sódico 1%, Aminoácidos no esenciales 1%, Bicarbonato de sodio 2 g/L, Penicilina/Estreptomicina 10,000 U/mL de Penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina 1%. Se utiliza agua destilada estéril y se ajusta el pH a 7.4.

II. Materiales biológicos

Cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Línea celular K-562 (ATCC® CCL-243™). Células humanas aisladas de la médula ósea de una paciente que presentaba leucemia mielógena crónica. La línea celular fue donada por la DC. Sergio Gutiérrez Castellanos, miembro del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social.

III. Extracción de ciclodipéptidos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Se prepararon 10 mL de Caldo LB y se adicionó un aislado bacteriano de la cepa PAO1 con el propósito de formar un preinóculo. Éste se incubó por 24 h con movimiento a 37°C. Posteriormente, se introdujo el preinóculo en un matraz con 90 mL de Caldo LB y se incubó por 24 h con movimiento a 37°C. Pasado ese tiempo, se agregó el contenido a un matraz con 900 mL de Caldo LB, se incubó por 48 h igual en movimiento y a 37°C. Al finalizar el periodo de incubación, se separó el sobrenadante mediante centrifugación a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después los sobrenadantes se extrajeron tres veces agregando un volumen igual de acetato de etilo acidificado con ácido acético glacial al 0.01%, agitando por 2 minutos. Se desechó la fase acuosa y las fases orgánicas se colocaron en un matraz balón para ser evaporadas a sequedad por evaporación rotativa a 60°C. El residuo fue disuelto en 1 mL de metanol-acetonitrilo grado HPLC [1:1]. Estos extractos se concentraron hasta sequedad en vacío y se almacenaron a 4°C.

IV. Evaluación de los cambios morfológicos producidos por ciclodipéptidos bacterianos en células sanas mediante microscopía.

Se obtuvo una muestra de sangre de un donador sano con el propósito de estudiar los cambios morfológicos de las células de sangre al adicionarles CDPs.

La muestra se encontraba en un tubo para muestra sanguínea con EDTA, con un volumen total de 10 mL. Al momento en que se recibió la muestra, se dividió el volumen en una placa de 24 pozos (Corning). Se aplicaron dos tratamientos a la sangre total (concentración de 0.001 mg/mL de CDPs por 4 h y concentración de 0.001 mg/mL de CDPs por 2 h) además de un control sin tratamiento de CDPs. Este experimento se realizó por triplicado.

Se dejaron actuar los tratamientos por el tiempo requerido y posterior a ello se realizó la fijación de las muestras. Se tomó una gota de sangre en un extremo del portaobjetos y con la ayuda de otro portaobjetos se extendió la sangre por toda la superficie. Se dejaron secar por 5 minutos. Después se colocaron dos varillas de forma paralela sobre una charola y se colocaron los frotis sobre ellas. Se agregó colorante Wright (Hycel) de manera que el frotis quedara completamente cubierto. Y se dejaron reposar por 10 minutos. Posteriormente se adicionó una solución amortiguadora (fosfato dibásico de sodio 11.4%, fosfato monobásico de potasio 4.9%, pH a 7.2) cantidad suficiente para mezclarse con el colorante y cubrir el frotis. Se dejó reposar durante 10 minutos. Pasado el tiempo se lavaron los frotis con agua hasta eliminar el exceso de colorante y se dejaron secar. Se colocó una gota de aceite de inmersión en una zona del frotis y se observó en un microscopio óptico utilizando el objetivo 100X. Se observó varios campos para analizar los cambios morfológicos producidos por los CDPs en comparación a las células de la muestra sin tratamiento. Se tomaron fotografías de varios campos observados.

V. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT

Para determinar la toxicidad de los CDPs utilizando el método colorimétrico MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma) se cultivaron 3×10^4 células por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning) en un volumen de 150 μ L de medio RPMI. Se adicionaron los tratamientos con la mezcla de CDPs en concentraciones (de 0.000001 mg/mL a 1 mg/mL). La placa se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas. Pasado ese tiempo se adicionaron 20 μ L de MTT a cada pozo y se dejó actuar durante 4 horas. Después se disolvieron los cristales de formazan producidos con 100 μ L isopropanol-HCL (19:1 v/v). Se dejó actuar por 30 minutos en oscuridad y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro para microplacas a 570 nm. Como control positivo de muerte se adicionó Vincristina (Ulsa Tech) en una concentración de 100 nM.

VI. Detección de producción de especies reactivas de oxígeno.

Las células se incubaron en una placa de 96 pozos (3×10^4 células por pozo) y se aplicaron los siguientes tratamientos: un control sin tratamiento, un control con Dihidroetidio (DHE, ThermoFisher), ciclodipéptidos bacterianos a distintas concentraciones (0.0001, 0.001 y 1 mg/mL), además de un control de muerte aplicando Vincristina en una concentración de 100 nM. Se dejaron actuar por 2 y 4 horas. Trascorrido ese tiempo, se adicionaron 4 μ L de Dihidroetidio (DHE) y se dejó en oscuridad por 30 minutos. Se leyeron las intensidades de fluorescencia con ayuda de un citómetro de flujo (BD Accuri).

VII. Evaluación de muerte celular por citometría de flujo

Para este ensayo se utilizaron marcadores de muerte celular por apoptosis (anexina V; Life technologies) y necrosis (yoduro de propidio; Sigma). Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (3×10^4 células por pozo; Corning) en un total de 150 μ L de medio RPMI. Después se adicionaron los tratamientos de CDPs y se incubaron las placas por 4 h a 37°C y 5% de CO₂. Trascorrido ese tiempo, se recolectó el contenido de cada pozo en un tubo Eppendorf y se centrifugaron las células a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 100 μ L de Buffer fosfato salino (PBS; estéril a pH 7.4) centrifugando a 2000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células con 20 μ L de buffer de unión a Anexina (10 mM de HEPES, 140 mM NaCl₂; pH 7.4). Se agregó 1 μ L de Anexina V y 1 μ L de Yoduro de Propidio, y se dejó actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 80 μ L de buffer de unión a Anexina V y se mezcló cuidadosamente.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo C6 BD Accuri. Para detectar apoptosis se analizó la emisión de fluorescencia en el canal FL1 a 535/617 nm y para detectar necrosis se analizó la emisión de fluorescencia en el canal FL2 a 535/617 nm. Como control de muerte se adicionó tratamientos con Vincristina en una concentración de 100 nM. Se analizó un mínimo de 10,000 eventos celulares.

RESULTADOS

I. Los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 no generan cambios morfológicos en células sanas

Se evaluó la citotoxicidad de los ciclodipéptidos a través de los cambios morfológicos en células sanas de sangre total, obtenidas por un donador sano, con el propósito de verificar el efecto de los CDPs sobre células sanas.

Vázquez en 2015 realizó una prueba con las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2 comparando estos resultados con la línea celular NOVA (no cancerosa). Las tres líneas celulares fueron tratadas con diversas concentraciones de CDPs. Las líneas celulares cancerosas mostraron claras afectaciones ya que adoptaron una morfología redonda y de menor tamaño en comparación con las células sin tratamiento. Por otro lado, las células NOVA no mostraron diferencias en su morfología con el tratamiento de los CDPs.

En este proyecto se realizó un ensayo aplicando diversas concentraciones de CDPs en células sanas de sangre total. Después de separar la alícuota de sangre, aplicar tratamientos y fijar las muestras, se estudiaron múltiples campos en el microscopio para observar cambios morfológicos en comparación con el control (sin tratamiento de ciclodipéptidos).

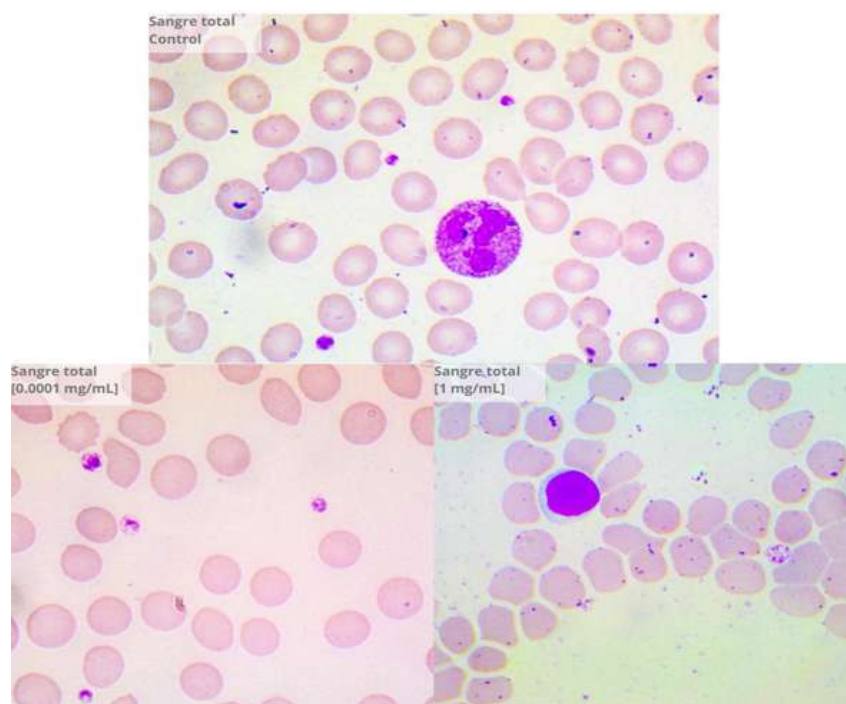


Figura 10. Cambios morfológicos en sangre total después de tratamientos de CDPs. Micrografía (100x) tomada de una muestra de sangre total.

Como se presenta en la figura 10 no se observaron cambios morfológicos en las muestras tratadas con CDPs en comparación con las células control (sin tratamiento). Los resultados de este experimento concuerdan con los resultados que obtuvieron Vázquez *et al.* en el 2015, trabajo en el cual se aprecian los tratamientos empleados en células sanas y, en comparación con el efecto de los tratamientos en células cancerosas, no presentan daños ni cambios morfológicos.

Este resultado sugiere que las células de sangre no se ven afectadas por el contacto con los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1.

II. Los ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 presentan efecto citotóxico en la línea celular K562

Con la finalidad de evaluar el efecto citotóxico de la mezcla de los ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre la línea celular K562 se realizó el ensayo colorimétrico adicionando el reactivo MTT. A continuación, se muestra la gráfica con los resultados del presente ensayo (figura 11).

Los tratamientos aplicados fueron de concentraciones de 0.000001 a 1 mg/mL de CDPs, además de dos controles: un control positivo de muerte aplicando Vincristina en una concentración 100 nM y un control negativo (PBS).

En el eje x de la gráfica se muestran las concentraciones de la mezcla de CDPs ciclo (L-Pro-L-Val), ciclo (L-Pro-L-Phe) y ciclo (L-Pro-L-Tyr) aplicadas en el ensayo (de 0.000001 a 1 mg/mL). En el eje y se muestra el porcentaje de viabilidad.

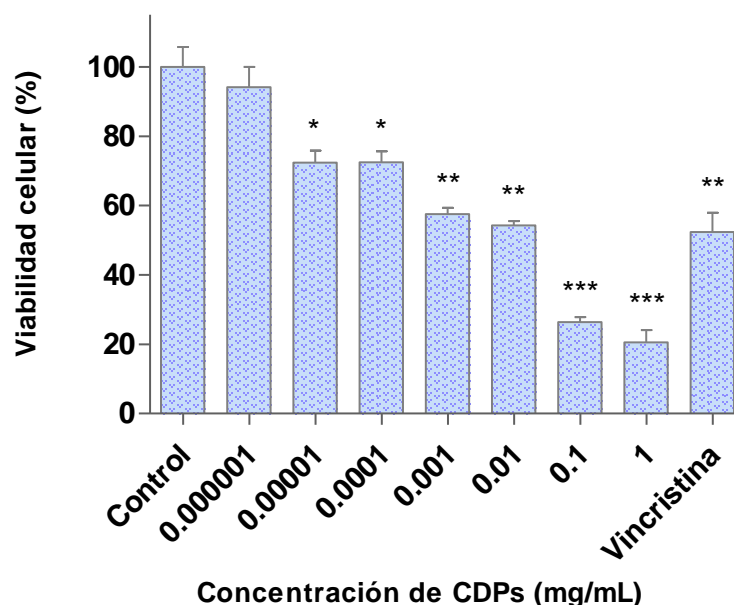


Figura 11. Ensayo de viabilidad celular MTT en K562 al aplicar ciclodipeptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Cultivos de células de leucemia K562 crecidas por 48 h fueron tratadas con los CDPs bacterianos por un lapso de 24 h y posteriormente se les evaluó la viabilidad celular mediante el método de MTT. Las barras representan el promedio de una $n = 3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Bonferroni. Los asteriscos en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes; $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***).

Como se aprecia en la figura anterior, la viabilidad de las células fue afectada por la mezcla de los CDPs; logrando una disminución de la viabilidad celular de alrededor del 80% aplicando la concentración de 1 mg/mL. Se calculó la IC50 obteniendo un valor de 3 μ g/mL.

También se muestra el resultado al aplicar el medicamento Vincristina. La vincristina es un antineoplásico aplicado como quimioterapia para pacientes con leucemias, linfomas y algunos tipos de sarcomas. La inhibición que desencadenó la vincristina logró una disminución de la viabilidad de alrededor del 45%, esto significa que los ciclodipeptidos presentaron mejores resultados en comparación con la vincristina después del tiempo de tratamiento.

Comparando estos resultados con otros trabajos utilizando el mismo modelo de estudio (línea celular K562) se puede tomar el trabajo de Flores en 2018 en el cuál aplica diversas concentraciones de péptidos antimicrobianos de origen vegetal obteniendo una IC50 de 97.3 $\mu\text{g/mL}$, valor más elevado que el obtenido en el presente proyecto. Con esto se puede concluir que los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 presentan citotoxicidad sobre las células K562 y éstos tienen mayor efectividad que otras propuestas de tratamiento.

III. Los ciclodipéptidos bacterianos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno durante las primeras horas de tratamiento

Algunos efectos tóxicos causados por CDPs en líneas celulares se han asociado con el incremento del estrés oxidativo (Hernández *et al.*, 2017). Se estudió si el daño producido por los CDPs genera un desequilibrio en la homeostasis celular durante las primeras horas de tratamiento. Se realizó un ensayo para determinar si la producción de especies reactivas de oxígeno fue alterada por los tratamientos con CDPs. El experimento fue llevado a cabo mediante citometría de flujo y la adición del reactivo DHE (el cuál identifica principalmente el radical superóxido mitocondrial). Como se mencionó con anterioridad, se seleccionaron tres concentraciones de CDPs utilizadas en el experimento de viabilidad celular.

En las siguientes imágenes (figura 14) se observan gráficas de puntos representativas mostrando el porcentaje de células apoptóticas a dos y cuatro horas de tratamiento.

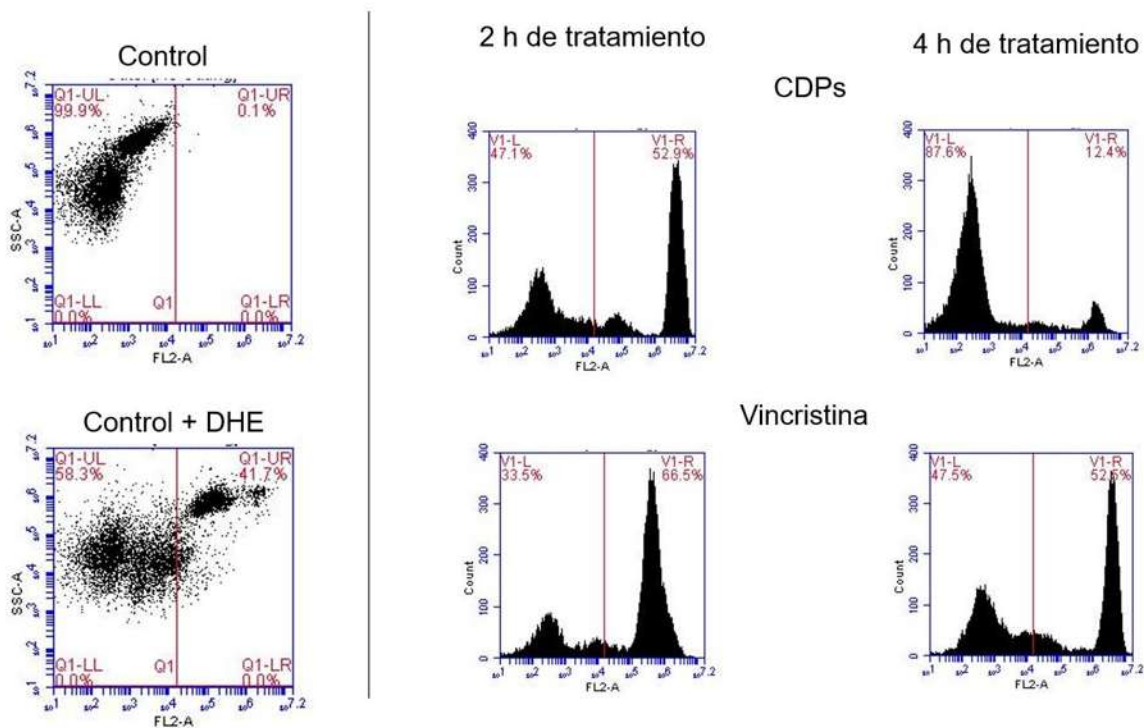


Figura 12. Gráficas de puntos de la producción de especies reactivas de oxígeno.

Se graficaron los resultados y se muestran a continuación (figura 15).

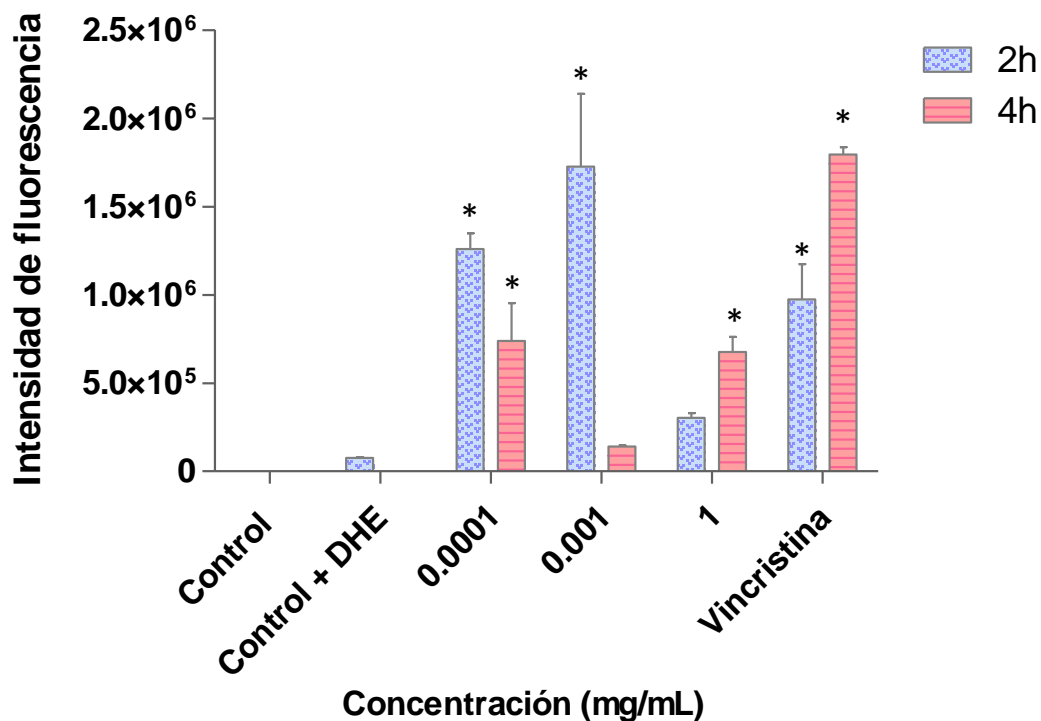


Figura 13. Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno.

Cultivos de células de leucemia K562 crecidas por 48 h fueron tratadas con los CDPs bacterianos por un lapso de 2 h y 4 h, posteriormente se les evaluó la producción de anión superóxido mediante citometría de flujo usando como sonda fluorescente el dihidroetidio (DHE). Como control positivo se utilizó a la Vincristina en una concentración de 100 nM. Las barras representan el promedio de una $n = 3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Bonferroni con una $P < 0.05$. Los asteriscos en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

Se puede apreciar en la figura 15 que la producción del radical superóxido se incrementa durante las primeras horas de tratamiento y la concentración del radical disminuye conforme avanza el tiempo. Estos resultados, junto con lo observado en el laboratorio, puede significar que, después de largos periodos de contacto CDPs-Células, las células se encuentran lo suficientemente dañadas o en estadios avanzados de muerte celular como para seguir produciendo especies reactivas de oxígeno.

Se logró la máxima concentración de superóxidos con la concentración de 0.001 mg/mL a 2 h de tratamiento.

IV. Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inducen apoptosis en K562

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos. Considerando los resultados del ensayo de citotoxicidad, se escogió la concentración de ciclodipéptidos de 0.001 mg/mL y se aplicaron tres controles: control con sólo las células K562, un control con el vehículo de los CDPs (PBS + DMSO) y un control de muerte adicionando Vincristina a una concentración de 100 nM.

Se incubaron durante 4 h a 37° y en una atmósfera con 5% CO₂. Transcurrido el tiempo, se adicionaron los marcadores de muerte celular: anexina V para apoptosis (debido a su capacidad para unirse a la fosfatidilserina, un marcador de apoptosis cuando se encuentra en la hemimembrana celular externa) y yoduro de propidio (el yoduro de propidio no es permeable en células vivas, se une al ADN de células necróticas mediante una intercalación entre las bases).

En la figura 12 se muestran los resultados pertinentes del experimento. Se observan las gráficas de puntos representativas de cada tratamiento. El eje x representa la intensidad de fluorescencia correspondiente a Anexina V y, el eje y se observa la intensidad de fluorescencia emitida por el yoduro de propidio.

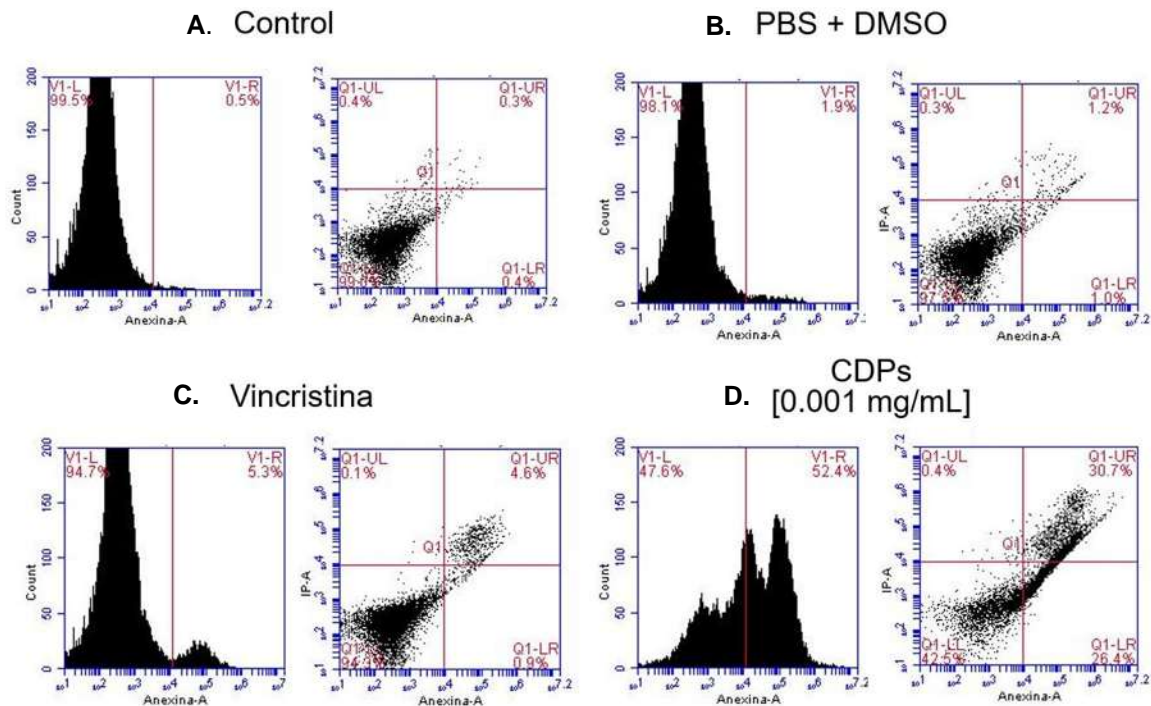


Figura 14. Gráficas de puntos del ensayo de muerte celular.

Gráficas de puntos representativas de los tratamientos para la determinación del tipo de muerte. A. Control (sólo células K562), B. PBS + DMSO (vehículo de los CDPs), C. Vincristina (medicamento para quimioterapias) y D. CDPs a una concentración de 0.001 mg/mL

Se logra apreciar que el control solo obtuvo un porcentaje de 0.5 % de células apoptóticas, este valor aumento mínimamente para el caso de PBS + DMSO con un 1.9% de células apoptóticas. El efecto de la Vincristina produjo un 5.3% de células apoptóticas. Para el caso de los CDPs, transcurrido el tiempo de tratamiento se obtuvo un porcentaje cercano al 50% de células apoptóticas.

Estos valores se ponderaron con los resultados de las repeticiones del experimento (n=3) y se graficaron (figura 13).

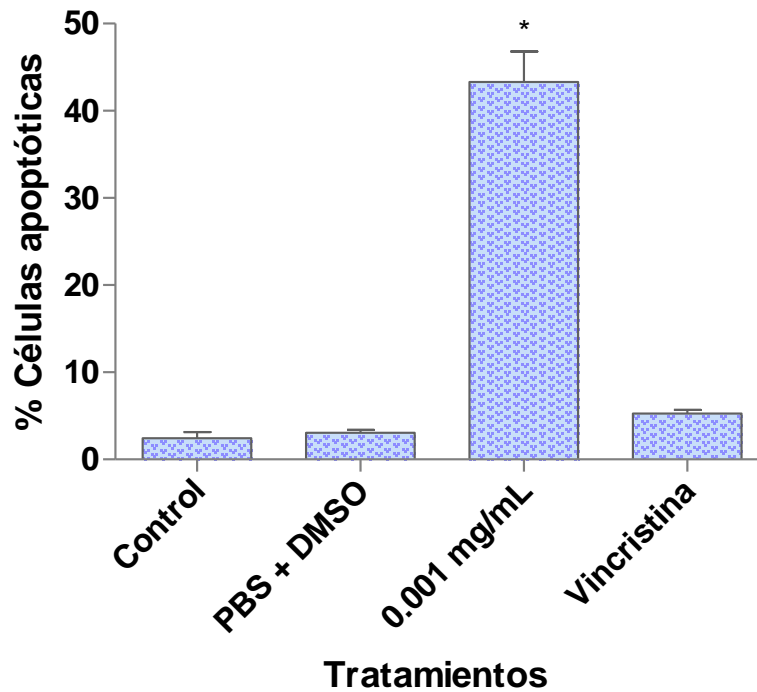


Figura 15. Resultados del ensayo del tipo de muerte celular.

Cultivos de células de leucemia K562 crecidas por 48 h fueron tratadas con los CDPs bacterianos por un lapso de 4 h, posteriormente se les evaluó la inducción de apoptosis mediante citometria de flujo usando como sonda en anticuerpo de anexina V. Como control positivo se utilizó a la vincristina. Las barras representan el promedio de una $n = 3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguida de una prueba post hoc de Bonferroni con una $P < 0.05$. Los asteriscos en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

Coincidiendo con trabajos anteriores (Vázquez *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2017) no se obtuvieron valores para yoduro de propidio. Al comparar las cuatro barras de la figura anterior se observa claramente que el efecto de los ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* PAO1 sobre K562 produce apoptosis.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido al gran problema de salud a nivel mundial que representa la leucemia, la búsqueda de nuevas moléculas antineoplásicas se ha vuelto un campo de estudio en creciente demanda. Dentro de esta búsqueda, se ha estudiado el efecto de diversas moléculas con el propósito de clasificar nuevas propuestas de medicamentos con actividades antiproliferativas. Se han reportados varios resultados exitosos; un caso específico son los ciclodipéptidos (CDPs).

Los CDPs son moléculas pequeñas con características interesantes para la producción de nuevos fármacos. Existen reportes de algunas actividades antitumorales de ciclodipéptidos: por ejemplo, los CDPs ciclo (*L*-Pro-*L*-Tyr) y ciclo (*L*-Pro-*L*-Phe), aislado de especies de *Bacillus*, 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). El equipo de trabajo del laboratorio de biotecnología microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas ha estudiado el efecto antiproliferativo y antitumoral de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, demostrando que disminuyen la viabilidad celular de las líneas celulares HeLa, CaCo-2 y B16-F0, además de inducir apoptosis en ellas.

En el presente estudio se analizó la efectividad de los ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* sobre la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica. Los resultados mostraron una disminución de viabilidad celular de alrededor del 80% aplicando una concentración de 1 mg/mL de CDPs durante 24 h. Se calculó la IC₅₀ obteniendo un valor de 3 µg/mL. Comparando este valor con los resultados reportados anteriormente, el valor de IC₅₀ de HeLa de 1 mg/mL (Hernández, 2017). Contrastando los resultados del laboratorio de biotecnología microbiana con otros trabajos, Flores y colaboradores, en 2018, estudiaron el efecto de PaDef (un péptido antimicrobiano de la fruta de aguacate) sobre la línea K562, en este proyecto se calculó una IC₅₀ de 97.3 µg/mL. El resultado obtenido en el presente es menor que los casos mencionados, logrando una alta efectividad en el proceso citotóxico.

Para el desarrollo de un nuevo fármaco antineoplásico, es necesario estudiar los posibles efectos secundarios que éste pudiera presentar. En 2015, Vázquez observó el efecto de los CDPs de *P. aeruginosa* en células NOVA (fibroblastos de pulmón de origen humano) reportando que éstas no mostraron diferencias en su morfología probando concentraciones hasta de 200 mg/mL sin mostrar algún efecto citotóxico (Vázquez, 2015). En el presente proyecto se estudió el efecto de las aplicaciones de CDPs sobre células sanas de una muestra de sangre total obtenida de un donador sano con el propósito de erradicar los efectos secundarios de las células no neoplásicas. Se adicionaron varias concentraciones de CDPs y como resultado se demostró que no afectaron la morfología de las células de sangre periférica con los tratamientos realizados, corroborando estudios previos.

Además, se estudiaron los niveles de especies reactivas de oxígeno durante la aplicación de ciclodipéptidos ya que existe evidencia que demuestra que las ROS tienen participación como inductores de apoptosis (Hao, *et al.*, 2020). Al realizar este experimento, se midieron los niveles del radical superóxido a tiempos cortos de contacto CDPs-células (2 y 4 horas). Se obtuvieron altos porcentajes del radical y éstos disminuyeron conforme avanzó el tiempo y se aumentó la concentración. Con este dato se demuestra que el daño de las células K562 avanza de manera acelerada dañando a las células en tiempos tempranos.

Para determinar el tipo de muerte que activa los CDPs en las células K562 se adicionó la concentración de ciclodipéptidos de 0.001 mg/mL durante 4 h y se obtuvo un porcentaje de células apoptóticas de ~ 50%. Como control de muerte se agregó Vincristina a una concentración de 100 nM obteniendo solo 5% de células apoptóticas transcurrido el tiempo. En 2018, Maldonado realizó un estudio para probar el efecto de los CDPs en la línea celular B16F/0 de melanoma murino. Haciendo una comparación con estos resultados, Maldonado obtuvo un 60% de células apoptóticas a 4 h de tratamientos con una concentración de 0.0126 mg/mL (Maldonado, 2018). Se observa en esta información que en el presente proyecto se obtuvo un porcentaje parecido de células apoptóticas a corto tiempo de contacto que reportes pasados, con la diferencia que el tratamiento que se aplicó fue 10 veces menor, además presentó mejores resultados que medicamentos en el mercado para quimioterapias.

Los datos obtenidos, junto con los reportados con anterioridad sugieren que los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 son una propuesta prometedora de terapia contra el cáncer.

CONCLUSIÓN

La mezcla de CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 desencadenan un efecto citotóxico de manera dosis dependiente, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno y así, induciendo apoptosis en la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica.

PERSPECTIVAS

Se recomienda continuar con este proyecto para evaluar las vías de señalización que participan en la inducción de apoptosis por efecto de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en la línea celular K562.

REFERENCIAS

- Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia (2017). *Efectos secundarios del tratamiento para la LLA*. Consultado el 1 de julio del 2020 en: <http://www.aeal.es/leucemia-linfoblastica-aguda-espana/11-efectos-secundarios-del-tratamiento-para-la-lla/#:~:text=%20Los%20siguientes%20efectos%20secundarios%20son%20comunes%20durante,6%20Dolor%20de%20cabeza%207%20V%C3%B3mitos%20More%20>.
- American Type Culture Collection (s/f). *K-562 (ATCC® CCL-243™)*. Consultado el 06 de mayo del 2019 en: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-243.aspx#>.
- Azad N., Iyer A.K.V. (2014) *Reactive Oxygen Species and Apoptosis*. In: Laher I. (eds) *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer. 113-135. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_15.
- Clínica Universidad de Navarra (s/f). *Leucemia*. Consultado el 18 de mayo del 2020 en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/leucemia>.
- Cortes, J. E., et al. (1996). *Chronic Myelogenous Leukemia: A Review*. The American Journal of Medicine 100 (5): 555–70. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(96\)00061-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(96)00061-7).
- Coutinho, H.D.M., et al. (2008). *Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers*. Int Arch Med 1, 24. <https://doi.org/10.1186/1755-7682-1-24>.
- de Carvalho, M. P., & Abraham, W. R. (2012). *Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines*. Current medicinal chemistry, 19(21), 3564–3577. <https://doi.org/10.2174/092986712801323243>.
- Degterev, A., & Yuan, J. (2008). *Expansion and evolution of cell death programmes*. Nature reviews. Molecular cell biology, 9(5), 378–390. <https://doi.org/10.1038/nrm2393>.
- Del Toro, G., (2006). *Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis, necrosis y formas alternativas de muerte celular*. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.
- Durán, M. X., et al., (2020). *Bacterial cyclodipeptides target signal pathways involved in malignant melanoma*. Frontiers in oncology. 19, 1111. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01111>.
- Favaloro, B., et al. (2012). *Role of apoptosis in disease*. Aging, 4(5), 330–349. <https://doi.org/10.18632/aging.100459>.
- Flores, L. J., et al. (2018). *PaDef defensin from avocado (Persea americana var. drymifolia) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through*

extrinsic apoptosis. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 99, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.013>.

Fundación Amigos del Niño con Leucemia y Cáncer (s/f). *Tumores sólidos*. Consultado el 01 de abril del 2020 en: <http://www.fanlyc.org/tumores-solidos/#:~:text=Los%20tumores%20I%C3%ADquidos%20son%20los%20que%20se%20originan,Tumores%20Abdominales%20y%20los%20Tumores%20de%20las%20Extremidades>.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hao, G., Zhai, *et al.* (2020) *Acetylshikonin induces apoptosis of human leukemia cell line K562 by inducing S phase cell cycle arret, modulating ROS accumulation, depleting Bcr-Abl and blocking NF-κB signaling*. Biomedicine and Pharmacotherapy, 122, 109677. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109677>.

Hernández, L., *et al.*, (2017). *The Antiproliferative Effect of Cyclodipeptides from Pseudomonas aeruginosa PAO1 on HeLa Cells Involves Inhibition of Phosphorylation of Akt and S6k Kinases*. *Molecules*, 22(6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>.

Hong, S., *et al.* (2008). *Inhibitory effect against Akt of cyclic dipeptides isolated from Bacillus sp.* *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(4), 682–685. PMID: 18467861.

Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). *Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(2), 357-375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>.

Instituto Nacional de la Salud (2020). *Efectos secundarios del tratamiento del cáncer*. Consultado el 29 de mayo del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/efectos-secundarios>.

Instituto Nacional de la Salud (2020-2). *Leucemia*. Consultado el 11 de mayo del 2020 en: <https://www.cancer.gov/types/leukemia>.

Instituto Nacional de la Salud (2019). *Radioterapia para tratar el cáncer*. Consultado el 27 de abril del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>.

Instituto Nacional de la Salud (2018). *Terapia dirigida para tratar el cáncer*. Consultado el 27 de abril del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida>.

Instituto Nacional de la Salud (2018-2). *Estadística del cáncer*. Consultado el 03 de junio del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas#:~:text=El%>

20n%C3%BAmero%20de%20casos%20nuevos%20de%20c%C3%A1ncer%20se,Tendencias%20de%20mortalidad%20por%20c%C3%A1ncer%20en%20EE.%20UU.

Instituto Nacional de la Salud (2018-3). *Terapias biológicas para el cáncer*. Consultado el 20 de julio del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-terapias-biologicas-respuestas>.

Instituto Nacional de la Salud (2015). *¿Qué es el cáncer?* Consultado el 15 de marzo del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.

Instituto Nacional de la Salud (2015-2). *Quimioterapia para tratar el cáncer*. Consultado el 27 de abril del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>.

Instituto Nacional de la Salud (2015-3). *Trasplante de células madre en el tratamiento del cáncer*. Consultado el 01 de agosto del 2020 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/trasplante-de-celulas-madre>.

Instituto Nacional de la Salud (2015-4). *Factores de riesgo de cáncer*. Consultado el 01 de enero del 2021 en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo>.

Instituto Nacional del Cáncer (s/f). *Cromosoma Filadelfia*. Consultado el 06 de enero del 2021 en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cromosoma-filadelfia>.

Iracheta, M. L. (2007). *El suicidio y la muerte celular*. Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, 101, 2-33.

Juliusson, G., Hough, R. (2016). *Leukemia*. Progress in tumor research, 43, 87–100. <https://doi.org/10.1159/000447076>.

Kerr, J. F., et al. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer 1972:26: 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.

Kerr, J. F. (2002). *History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept*. Toxicology, 181-182, 471-474. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00457-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00457-2).

Klein, E., et al. (1976). *Properties of the k562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia*. Int. J. Cancer: 18, 421-431. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910180405>.

- Lawen, A. (2003). *Apoptosis- an introduction*. BioEssays, 25(9), 888-896. <https://doi.org/10.1002/bies.10329>.
- Leukemia and Lymphoma Society. (2018). *Chronic Myeloid Leukemia*. Consultado el 1 de agosto de 2019 en: <https://www.lls.org/leukemia/chronic-myeloid-leukemia>.
- Li, X.; et al. (2006) *Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, Streptomyces fungicidicus*. Biofouling, 22, 201–208. <https://doi.org/10.1080/08927010600780771>.
- Lind, H., et al. (2007). *Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains*. FEMS Microbiology Letters. (2):310-5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00730.x>.
- Mayo Clinic; (s/f) *Leucemia*. Consultado el 27 de junio del 2020 en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/leukemia/diagnosis-treatment/drc-20374378>
- Milne, P. J., et al. (1998). *The biological activity of selected cyclic dipeptides*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 50(12), 1331–1337. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03355.x>.
- Mishra, A., et al. (2017). *Cyclodipeptides: An Overview of Their Biosynthesis and Biological Activity*. Molecules, 22(10), 1796. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22101796>.
- Morgan, A., et al. (2010). *Staphylococcus aureus nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence*. Science. (329): 294-296. <https://doi.org/10.1126/science.1188888>.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Cáncer*. Consultado el 08 de marzo del 2020 en: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- Organización Mundial de la Salud (2018). *El cáncer infantil: Datos y cifras*. Consultado el 19 de mayo del 2020 en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer-in-children>.
- Organización Mundial de la Salud (2018-2). *Cáncer*. Consultado el 15 de mayo del 2020 en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Organización Mundial de la Salud (2017). *10 datos sobre el cáncer*. Consultado el 21 de mayo del 2020 en: <https://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>.
- Organización Mundial de la Salud (2016). *Cáncer: El cáncer infantil*. Consultado el 20 de mayo del 2020 en: <https://www.who.int/cancer/es/>.
- Organización Mundial de la Salud. (2014). *Cáncer. Preguntas frecuentes sobre el cáncer infantil*. Consultado el 19 de mayo del 2020 en: https://www.who.int/cancer/media/news/Childhood_cancer_day/es/.

- Ortiz, R., et al. (2011) *Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 17, 7253-7238. <https://doi.org/10.1073/mnas.1006740108>.
- Pinar, M. T., et al. (2019). *Biological effects of whole Z. Officinale extract on chronic myeloid leukemia cell line K562*. Gene 692, 217-222. <https://doi.org/10.1016/J.gene.2019.01.015>.
- Rafieemehr, et al. (2019). *Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of a Case-Control Study*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 20, 2477- 2483. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.8.2477>.
- Romero G. A. (2020). *Myeloid chronic leukemia: a treatment paradigm in oncohematology*. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 36(3), e1308. Consultado el 21 de julio del 2021 en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892020000300001&lng=es&tlng=en.
- Rumbaugh, K. P. (2007). *Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface*. Anal Bioanal Chem 387, 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0694-9>.
- Schweichel, J. U., Merker, H.J., (1973). *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*. Teratology. 7(3):253-66. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>.
- Secretaria de Salud (2017). *Cáncer, tercera causa de muerte en México*. Consultado el 03 de agosto del 2020 en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>.
- Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 306(5698), 990–995. <https://doi.org/10.1126/science.1099993>.
- Silby, M. W., et al. (2011). *Pseudomonas genomes: diverse and adaptable*, FEMS Microbiology Reviews, 35 (4), 52–680, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.
- Sociedad americana del Cáncer (2020). *Control de efectos secundarios relacionados con el cáncer*. Consultado el 15 de junio del 2020 en: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/efectos-secundarios-fisicos.html>.
- Sociedad americana del Cáncer (2019). *¿Qué es la leucemia mieloide crónica?* Consultado el 10 de noviembre del 2020 en <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-cronica/acerca/que-es-leucemia-mieloide-cronica.html>.

- Stover, C., et al. (2000) *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen.* Nature 406, 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>.
- Ström, K., et al. (2002) *Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid.* Applied and Environmental Microbiology, 68, 4322-4327. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002>.
- Vázquez, D., et al. (2015). *Cytotoxicity of cyclodipeptides from Pseudomonas aeruginosa PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines.* BioMed research international, 197608. <https://doi.org/10.1155/2015/197608>.
- Weinberg, R. A. (1989). *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis.* Cancer Research 49, 3713-3721.
- Whiteside M. G. (1979). *The leukaemias.* Australian family physician, 8(4):381-3, 385-6, 388-9 passim.
- Wong, R. S. (2011). *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment.* Journal of experimental & clinical cancer research: CR, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.

