



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

Título de la tesis:

**“Efecto de los ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*
sobre la vía de señalización mTOR/PI3K/Akt/S6k en células cancerosas
humanas”**

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Experimental

PRESENTA:

Química Farmacobióloga Laura Hernández Padilla

Asesor:

Doctor en Ciencias en Biotecnología Jesús Campos García

Co-asesor:

Doctor en Ciencias en Ciencias en Biología Experimental Víctor Meza Carmen

Morelia, Mich. Diciembre 2016



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1 Importancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.2 Quorum sensing en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.3 Ciclodipéptidos o 2,5 dicetopiperazinas.....	4
1.1.4 Síntesis de ciclodipéptidos a través de ciclodipéptidos sintasas (CDPS).....	5
1.1.5 Síntesis de ciclodipéptidos por péptido sintasas no ribosomales (NRPS).....	6
1.1.6 Actividades biológicas de los ciclodipéptidos.....	8
1.1.6.1 Quiralidad de los ciclodipéptidos y su relación con la actividad biológica ...	10
1.1.6.2 determinación de la configuración absoluta en compuestos quirales	12
1.2 Generalidades del cáncer.....	16
1.2.1 La célula cancerosa	18
1.2.2 Genes asociados al cáncer	19
1.2.3 Cáncer cérvico-uterino	20
1.2.4 Cáncer colorrectal	20
1.2.5 Tipos de muerte celular	21
1.2.5.1 Necrosis.....	21
1.2.5.2 Necroptosis.....	22
1.2.5.3 Autofagia.....	22
1.2.5.4 Piroptosis.....	23
1.2.5.5 Apoptosis.....	23
1.2.5.5.1 Caspasas.....	24
1.2.5.5.2 Vía extrínseca ó mediada por receptor	25
1.2.5.5.3 Vía intrínseca o mediada por mitocondria.....	26
1.2.5.5.4 La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR implicada en el cáncer	28
2.ANTECEDENTES.....	31
3. JUSTIFICACION	31

4. HIPOTESIS	32
5. OBJETIVO GENERAL:	32
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	32
7. MATERIALES Y METODOS	33
7.1 Medios de cultivo	33
7.2 Materiales biológicos	33
7.3 Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	34
7.4 Extracción de ciclodipéptidos	34
7.5 Purificación de los ciclodipéptidos	34
7.6 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	35
7.7 Cultivo celular	36
7.8 Criopreservación	36
7.8.1 Congelamiento de células.....	36
7.8.2 Descongelamiento de células	37
7.9 Ensayo de viabilidad celular por MTT.....	37
7.10 Evaluación de apoptosis/necrosis mediante el ensayo de Anexina V/Yoduro de Propidio	38
7.11 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).....	38
7.12 Lisis celular	39
7.13 Geles desnaturalizantes SDS-PAGE	39
7.14 Western blot.....	40
7.14.1 Transferencia de proteínas	40
7.14.2 Inmuno-detección.....	40
7.14.3 Revelado.....	41
8. Análisis estadístico de los resultados.	41
9. RESULTADOS.....	41
9.1 Obtención de la mezcla de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1	41
9.2 Purificación de los CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	42
9.3 Efecto citotóxico de los CDPs purificados producidos por <i>P. aeruginosa</i> en líneas celulares cancerosas humanas	44
9.4 Evaluación de la apoptosis inducida por la mezcla de los CDPs de <i>P. aeruginosa</i>	48
9.5 Efecto de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en líneas celulares cancerosas humanas	52

9.6 Evaluación de la apoptosis inducida por la mezcla de los CDPs sintéticos analogos a los producidos por <i>P. aeruginosa</i>	56
10. DISCUSIÓN	57
11. CONCLUSIÓN	59
12. BIBLIOGRAFÍA.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Representación de los factores de virulencia producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Figura 2. Estructura general de los ciclodipéptidos ó 2,5-dicetopiperazinas.....	5
Figura 3. Síntesis de ciclodipéptidos por ciclodipéptido sintasas (CDPS).....	6
Figura 4. Diagrama de la síntesis de péptidos a través de las péptido sintasas no ribosomales	7
Figura 5. Quiralidad de una molécula.....	11
Figura 6. Enantiómeros del ácido láctico (<i>d-</i> y <i>l-</i>).....	12
Figura 7. Características del cáncer.....	17
Figura 8. Vías de inducción de apoptosis.....	27
Figura 9. Nodos de señalización clave que regulan la vía mTOR.	30
Figura 10. Analisis por cromatografía líquida de la mezcla cruda de CDPs producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	42
Figura 11. Analisis por cromatografía líquida de los CDPs purificados producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	43
Figura 12. Efecto citotóxico de los CDPs purificados producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células HeLa y CaCo crecidas en medio completo.	45
Figura 13. Efecto de los CDPs purificados producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio incompleto.....	47
Figura 14. Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs purificados producidos por <i>P. aeruginosa</i> en células HeLa.....	48
Figura 15. Porcentaje de apoptosis inducida por los CDPs purificados producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio completo.....	50
Figura 16. Porcentaje de apoptosis inducida por los CDPs purificados producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio incompleto.....	52
Figura 17. Efecto citotóxico de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en células HeLa y CaCo crecidas en medio completo.....	54

Figura 18. Efecto de los CDPs sintéticos analogos a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio incompleto.....56

Figura 19. Porcentaje de apoptosis inducida por la mezcla de los CDPs sintéticos analogos a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio completo.....57

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Composición de dicetopiperazinas antimicrobianas naturales.....15

Tabla 2. Gradiente utilizado en análisis por HPLC para purificación de CDPs35

Tabla 3. Gradiente utilizado en análisis por HPLC para análisis de CDPs purificados.36

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista de plantas y animales, que produce factores de virulencia para infectar y colonizar al huésped. Recientemente se ha identificado un nuevo tipo de moléculas bacterianas que actúan como factores de virulencia, conocidas como ciclodipeptidos (CDP). Además, se consideran como una clase novedosa de moléculas pequeñas sintetizadas por microorganismos, y que poseen actividades biológicas tales como anticancerígenos, antifúngicos y antibióticos. En este trabajo se describe que la mezcla de los CDP producidos por *P. aeruginosa* ciclo (L-Pro-L-Tyr), ciclo (L-Pro-L-Val) y ciclo (L-Pro-L-Phe) son citotóxicos en las líneas celulares HeLa y CaCo-2, cuya inhibición de la proliferación celular implica una vía apoptótica. Los resultados mostraron que las fracciones purificadas mediante HPLC de los CDP producidos por *P. aeruginosa* son capaces de inducir apoptosis dependiente de la concentración en los mismos niveles que la mezcla en las líneas HeLa y CaCo-2, mientras que los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *P. aeruginosa* mostraron menos citotoxicidad sobre estas líneas celulares cancerosas. Los resultados indican que el efecto producido por los CDP purificados y su mezcla mostró una actividad citotóxica incrementada comparada con los CDP sintéticos, lo que sugiere un efecto asociado de las propiedades estereoquímicas de los CDPs de origen bacteriano con su actividad biológica. Además, los resultados indican que la mezcla de CDPs fue más activa para la inducción de apoptosis en las líneas celulares HeLa y CaCo-2 que los compuestos aislados. Por último, este estudio sugiere que los CDP podrían ser considerados moléculas potenciales para la terapia contra el cáncer.

PALABRAS CLAVE: (Citotóxicos, ciclodipeptidos, apoptosis, proliferación celular, HeLa)

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium of plants and animals, which produces virulence factors to infect and colonize the host. Recently a new kind of bacterial molecules that act as virulence factors have been identified, these are known as cyclodipeptides (CDPs). Additionally, these are considered as a novel class of small molecules synthesized by microorganisms, and which possess biological activities such as anti-cancer, anti-fungal, and antibiotic. In this work, we describe that the mixture of the CDPs produced by *P. aeruginosa* cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val) and cyclo(L-Pro-L-Phe) exhibit cytotoxic properties in the HeLa and CaCo-2 cancer cells lines, whose inhibition of cell proliferation involves an apoptotic pathway. Results showed that the fractions of the CDPs produced by *P. aeruginosa* purified by HPLC were capable of induce in same levels apoptosis in HeLa and CaCo-2 lines, with a dose-dependent manner, while the CDPs analogs and with synthetic origin showed less cytotoxic effects on these cancer cell lines. The findings indicate that the effect produced by the purified CDPs and its mixture showed increased cytotoxic activity than the synthetic CDPs, suggesting an effect associated with their stereochemical properties of the bacterial origin with its biological activity. Additionally, the results indicate that the CDPs mix was more active for induction of apoptosis in the HeLa and CaCo-2 lines than the isolated compounds. Finally, this study suggest that the CDPs could be considered as a potential anti-cancer molecules.

KEY WORDS: (Cytotoxic, cyclodipeptides, apoptosis, cell proliferation, HeLa)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, en forma de bacilo ligeramente curvado, aerobio y con un flagelo polar (Stover *et al.*, 2000). Es un microorganismo versátil y ubicuo ya que se encuentra distribuido en diferentes ambientes, incluyendo terrestre y acuático, además de hospedero en animales, humanos y plantas. Es un patógeno oportunista ya que causa infecciones en pacientes inmunocomprometidos causando infecciones gastrointestinales y urinarias, así como neumonía, otitis y queratitis. Su versatilidad y su gran habilidad adaptativa es debido a su amplio genoma, con cerca de 6000 genes, que radican en la presencia de sus diversas vías metabólicas, factores de virulencia, transporte y flujo de nutrientes y quimiotaxis (Coutinho *et al.*, 2008; Silby *et al.*, 2011). Además ésta bacteria es capaz de coordinar vías metabólicas optimizando sus nutrientes y potencial reproductivo dependiendo del ambiente y nutrientes en que se encuentre, por lo tanto, *P. aeruginosa* puede sobrevivir, crecer y causar infecciones en diferentes ambientes (Silby *et al.*, 2011; Rau *et al.*, 2010).

Muchos de los factores relacionados a virulencia mejor estudiados de *P. aeruginosa* con las proteínas y/o células del huésped, incluyen los sistemas de secreción (tipo I, II, III y IV) y efectores asociados (incluidos ExoT, ExoU, ExoS, ToxA, fosfolipasa C y proteasa alcalina), flagelo y estructuras involucradas en la unión a las células del huésped como pili tipo IV. Otros factores de virulencia incluyen la presencia de flagelina y pili, además de aquellos involucrados en la adquisición de hierro (pioquelina y pioverdina), síntesis de pequeñas moléculas/toxinas (fenazinas, ácido cianhídrico), alginato, lipopolisacáridos (LPS), producción de biofilm y las involucradas en el quórum sensing (homoserina lactonas y quinolonas), (Feinbaum, *et al.*, 2012; Tiam, *et al.*, 2012).

1.1.1 Importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

Esta bacteria es de importancia clínica ya que es un importante patógeno oportunista para humanos capaz de resistir a varios antibióticos y desinfectantes (Madigan MT *et al.*, 2004), afectando a

víctimas de quemaduras, infecciones de tracto urinario de pacientes cateterizados, y neumonía en pacientes intrahospitalarios por lo que se encuentra entre las principales causas de infecciones nosocomiales (Jayaseelan, et al., 2013).

P.aeruginosa es causa predominante de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis cística, en donde para establecer éste tipo de infección crónica se observa su morfología colonial mucoide; la cual es debido a la sobreproducción de alginato, haciéndose más difícil de erradicar ya que adquiere una alta resistencia a antibióticos, así como a la respuesta inmune del hospedero, un ejemplo de ello es que se vuelve resistente a la fagocitosis mediada por neutrófilos y macrófagos (**Figura 1**) (Sousa y Pereira.,2014) .

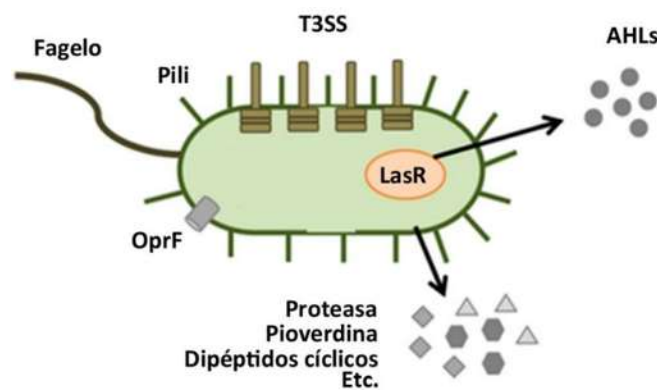


Figura 1. Representación de los factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* está ampliamente equipada con factores de virulencia, incluyendo flagelo, pili, sistema de secreción tipo 3 (T3SS), OprF y factores de virulencia secretables (ej. Proteasas, pioverdina y dipéptidos cíclicos).

1.1.2 Quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*

El Quorum sensing es el proceso de comunicación célula a célula, necesario para la producción y posterior detección de señales químicas extracelulares llamadas autoinductores, los cuales son usados para coordinar la expresión genética durante dicho proceso (Kendra, 2007).

El quórum sensing fue descubierto en la bacteria luminosa marina *Vibrio fischeri*, que es un simbiote facultativo de peces marinos y calamares. Interesantemente, la bioluminiscencia solo se presenta cuando existe la interacción simbiótica y no en el estado de vida libre. Esta regulación de la bioluminiscencia esta mediada por el sistema LuxI-LuxR que pertenece a la red de señalización de quórum sensing. LuxI sintetiza la señal que es una acil-homoserina lactona (AHL) de seis carbonos, 3-oxo-hexanoil-HSL, y a medida que las AHL se acumulan llevan a la unión y activación de su regulador específico LuxR. El LuxR activado se une a secuencias palindrómicas específicas del ADN, llamadas “caja lux”, donde recluta a la ARN polimerasa, así aumentando la expresión de genes (Gonzalez y Keshavan, 2006).

Uno de los sistemas de comunicación célula a célula más estudiados es el de *P.aeruginosa* el cual tiene dos sistemas distintos las *rhl* (Li, et al;2012). Estos sistemas *las* y *rhl* son homólogos al sistema LuxR-LuxI de *V. fischeri*, por lo que el modelo de señalización por quórum sensing funciona de una manera similar. La gran mayoría de sistemas de quórum sensing en bacterias Gram negativas que han sido estudiadas utilizan AHL como moléculas señalizadoras (de Kievit e Iglewski, 2000).

Además de las AHL, se sabe que existen otros tipos de señales autoinducidas, cuyas estructuras son químicamente diferentes y cada una de ellas forman parte de una red regulatoria diversa, como autoinducidos, ciclo dipéptidos, y otros (Gonzalez y Keshavan, 2006; Atkinson y Williams, 2009). En la bacteria *P. aeruginosa* el sistema de percepción de quórum bacteriano (QS), se encontró que el sistema LasI/LasR modifica la producción de tres DCPs, ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), los cuales presentaron propiedades en la estimulación del crecimiento vegetal de *A. thaliana* (Ortiz-Castro et al., 2011; 2013a; 2013b; 2014).

El sistema de comunicación quorum sensing en bacterias gramnegativas está bajo el control de las acil homoserina lactonas (AHLs) y sus receptores (las proteínas tipo LuxR) en donde su principal participación es mediando las interacciones bacteria-hospedero (Lyon, et al; 2003). Recientemente, se reportó un grupo de moléculas llamadas ciclodipéptidos (2,5-dicetopiperazinas ó DKPs) aisladas de un amplio rango de bacterias gramnegativas, las cuales modulan activando ó inactivando proteínas tipo Lux-R en cepas biosensoras de AHLs, que comparando con las lactonas nativas se obtiene un umbral de inducción de la proteína LuxR mucho mayor, alrededor

10⁶(Holden, et al.,1999; Degrassi, et al.,2002). Con todo esto, se llegó a la conclusión de que las dicetopiperazinas representan una nueva clase de moléculas de señalización entre reinos y especies (Jennifer Campbel, et al., 2009).

1.1.3 Ciclodipéptidos o 2,5 dicetopiperazinas

Las dicetopiperazinas son una clase de moléculas pequeñas, derivadas de la condensación de dos aminoácidos, biosintetizadas por un amplio rango de microorganismos. Se sabe que el 90% de las bacterias gramnegativas los sintetizan. También han sido aislados de bacterias grampositivas, hongos, plantas y organismos marinos (Carvalho, et al., 2012). El anillo de la molécula de CDPs se compone de 6 miembros, los cuales orientan sus sustituyentes de manera espacial definida, por lo que debido a sus características estructurales estables representa un importante farmacóforo en la química medicinal. Además, conociendo su simplicidad estructural y su libertad conformacional, las DKPs han sido ampliamente utilizadas como modelos de estudios conformacionales (ejemplo, cis, trans, isomerismo), reportándose amplias configuraciones relativas de los residuos aminoácidos (Budesinsky, et al., 2010; Ressurreicao et al., 2011).

Los ciclodipéptidos son abundantes en la naturaleza ya que están presentes en muchos metabolitos secundarios. Desde el punto de vista biológico, éstos pequeños componentes son capaces de unirse a un amplio rango de receptores (Adriano, et al.,2014). Además de que se ha reportado que la presencia del doble enlace exocíclico carbono-carbono proveniente del anillo de Los CDPs incrementa los efectos biológicos comparados con CDPs químicamente saturados (Kretzschmar G, et al., 2010). Aunque los CDPs son ampliamente obtenidos por extracción de fuentes naturales, éstos pueden ser fácilmente sintetizados, debido a su simplicidad estructural (Prasad, et al., 1995; Fischer, et al., 2003).

La mayoría de las reacciones que forman el enlace peptídico en organismos son llevadas a cabo por el ribosoma. Aunque se han reportado otras enzimas que se encargan de la formación de enlaces peptídicos, las cuales son una familia de enzimas formadoras de enlaces peptídicos dependen-

tes de los RNAs de transferencia (RNAt) llamadas ciclodipéptido sintetasas/sintasas no ribosomales (CDPS-NR); así como también por una familia de enzimas formadoras de enlace peptídico conocidas como ciclodipéptido sintetasas no dependientes de ATP (CDPS) (Finking, et al., 2004; Gondry et al., 2009; Watanabe, et al., 2007).

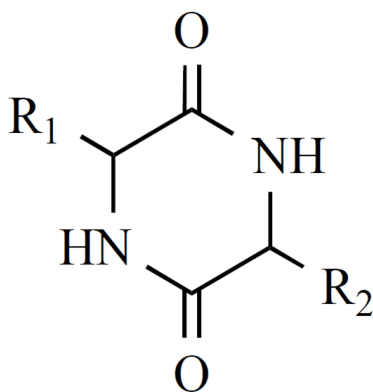


Figura 2. Estructura general de los ciclodipéptidos ó 2,5-diketopiperazinas. Ciclodipéptidos presentan dos aceptores y dos sitios donadores de puentes de hidrógeno importantes para la unión a receptores.

1.1.4 Síntesis de ciclodipéptidos a través de ciclodipéptidos sintetasas (CDPS)

Las CDPS (ciclodipéptido sintetasas) son proteínas pequeñas, al contrario de las NRPS, que son proteínas mucho más grandes. Las CDPS utilizan aminoacil-ARNt como sustratos para la formación de ciclodipéptidos y no son dependientes de ATP para la formación del enlace peptídico (Bonfond, et al., 2011). El uso de aa-tRNAs como sustratos implica que las DKPs son producidas mayoritariamente durante la fase de crecimiento exponencial, en la cual, los sustratos son abundantes. La mayoría de los ciclodipéptidos formados por CDPS tienen la configuración *L-L*.

Las CDPS usan dos aminoacil-ARNt como sustratos en un mecanismo secuencial tipo “ping-pong” para formar los dos enlaces peptídicos del ciclo-dipéptido. El primer paso catalítico involucra el enlace del primer aminoácido a la serina del sitio activo para formar un intermediario acil-enzima. El acil-enzima entonces reacciona con el aminoácido del segundo aminoacil-ARNt para formar un intermediario dipeptidil que mediante ciclación intramolecular, lleva a la formación final del ciclo-dipéptido (Moutiez, et al., 2014).

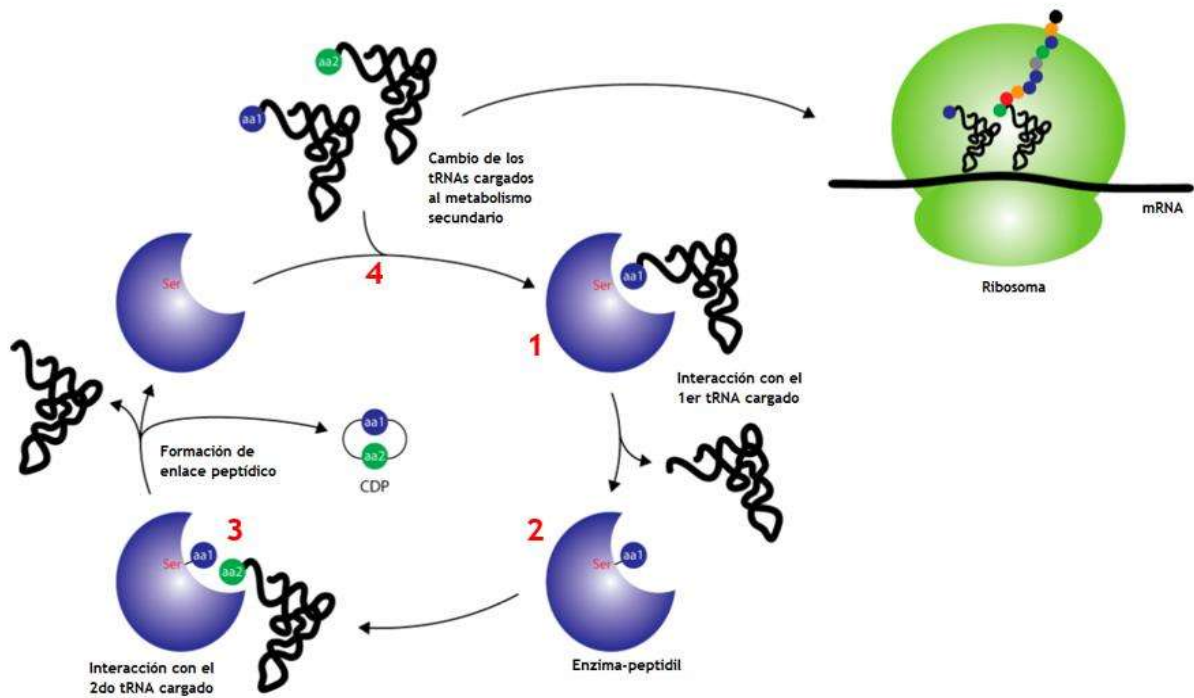


Figura 3. Síntesis de ciclodipéptidos por ciclodipéptido sintetasas (CDPS). Se observa la utilización de aa-RNAt como sustratos para la síntesis de ciclodipéptidos, la enzima utiliza un mecanismo tipo ping-pong en el cual incorpora un aa-RNAt, toma el aminoácido y el RNAt lo libera e incorpora otro aa-RNAt y después de captar el segundo aminoácido libera el segundo aa-RNAt, después lleva a cabo la ciclación del dipéptido.

La formación de ciclodipéptidos es a menudo el primer paso en la síntesis de DKPs más complejos que se obtienen después de reacciones de adaptación. Éste parece ser el caso de la síntesis de ciclodipéptidos por CDPSs, los cuáles no son probablemente los productos finales sino más bien intermediarios en la ruta biosintética de DKPs (Lixin Zhang, et al., 2013).

1.1.5 Síntesis de ciclodipéptidos por péptido sintetasas no ribosomales (NRPS)

Las péptido sintetasas no-ribosomales (PSNR) son una familia de enzimas esenciales responsables de la biosíntesis de muchos productos naturales usados en la industria farmacéutica, incluyendo antibióticos (por ej. vancomicina, penicilina), compuestos anticancerígenos (por ej. bleomicina, epotilona) e inmunosupresores (ciclosporina) (Byford, et al., 1997;Wyatt, et al., 2012).Las NRPS

son un gran complejo enzimático el cual se compone de módulos catalíticos independientes y cada módulo consiste de un grupo de dominios catalíticos necesarios para la incorporación de un aminoácido en la cadena peptídica naciente. Cada módulo es responsable de la incorporación de un aminoácido y está constituido por tres dominios: adenilación (A), tiolación (T) y condensación (C).

Los dominios de adenilación (A) seleccionan y activan a un aminoácido libre formando un aminoacil adenilato en un proceso que requiere ATP. El aminoácido activado es transferido a la proteína acarreadora de péptido (dominio PCP) la cual media la transferencia del aminoácido activado al dominio de condensación. El dominio de condensación (C) cataliza la formación del enlace peptídico, y el dominio parecido a la tioesterasa (dominio Te) libera el péptido sintetizado (Nathan A. Magarvey.,2010).

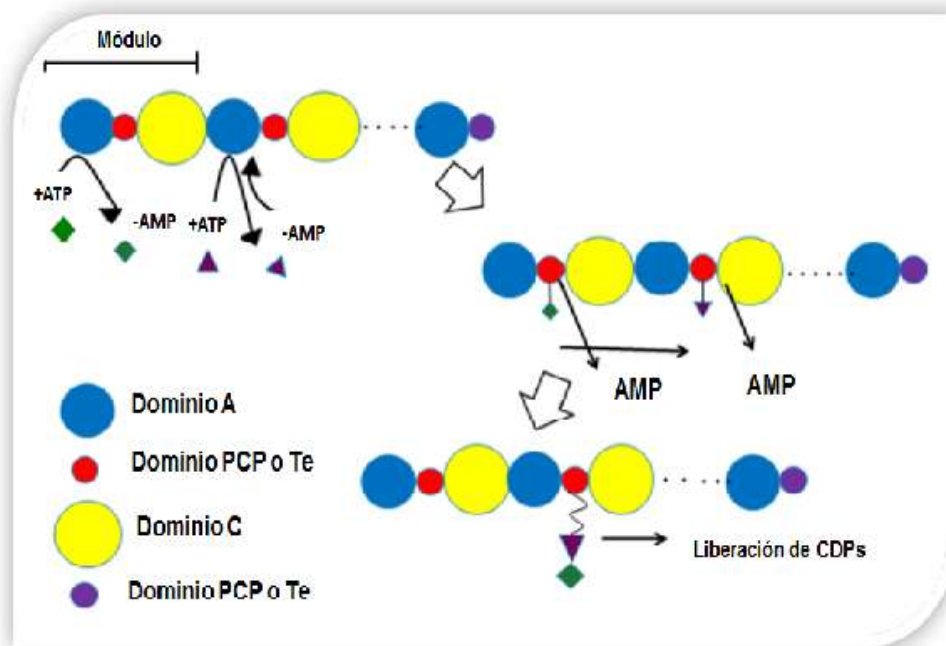


Figura 4.- Diagrama de la síntesis de péptidos a través de las péptido sintetasas no ribosomales. En triángulos se indican los aminoácidos. El dominio A es dominio de adenilación. PCP proteína acarreadora de péptido. Dominio C es dominio de condensación (Modificado de Hashimoto, 2006).

Los sistemas enzimáticos de PSNR y CDPS producen DKPs en la naturaleza. Las CDPS son proteínas pequeñas (alrededor de 26 kDa), mientras que las PSNR son sistemas multienzimáticos de alrededor de diez veces mayor tamaño comparado con las CDPS. La gran diferencia en tamaño se

debe a las estrategias que utilizan para la activación de los aminoácidos: 1) las PSNR utilizan a los dominios de adenilación y tiolación para reconocer y activar a los aminoácidos, además de requerir del empleo de ATP; y 2) las CDPS utilizan aminoacil-ARNt con lo que no requiere la activación del aminoácido. Por lo tanto, las CDPS están restringidas a los aminoácidos canónicos enlazados a los ARNt; mientras que el rango de sustratos que pueden ser usados por las PSNR es muy amplio, debido a que los sustratos pueden estar modificados previo o posterior a la síntesis enzimática y una variedad de orígenes, además de aminoácidos pueden emplear ácidos grasos, anillos hidrocarbonados, azúcares, etc (Belin, et al., 2012).

Cabe resaltar que los DKPs obtenidos a partir de CDPS solamente se tienen hipótesis acerca de su función, mientras que para las PSNR generalmente se le ha asignado una función (sideróforos, toxinas, etc.) (Belin, et al., 2012).

En contraste con péptidos lineales, los CDPs muestran ventajas químicas importantes, como la estabilidad a proteólisis, control de la estereoquímica de sus constituyentes y rigidez conformacional. Por lo cual, los CDPs son considerados agentes terapéuticos atractivos para el tratamiento de enfermedades como lo es el cáncer (McClelland, et al., 2004; Horton. et al.,2000).

1.1.6 Actividades biológicas de los ciclodipéptidos

Los ciclodipéptidos producidos por una amplia variedad de organismos tienen la habilidad para simular grupos peptídicos que funcionan como farmacóforos, además de que son capaces de interaccionar con blancos moleculares de las células debido a sus grupos aceptores y donadores de los enlaces hidrogeno, por lo que se les han encontrado diversas actividades biológicas como, antivirales, antifúngicas, antibacterianas, así como inductores de apoptosis.

Algunas de las actividades biológicas importantes de las dicetopiperazinas es la inhibición del inhibidor PAI-1 el cual es un activador plasminogénico perteneciente a la familia de los inhibidores serin proteasas, que contribuye a la progresión de tumores (Teresa D.Brooks, et al., 2003). Además de que los ciclodipéptidos ciclo (L-Phe-L-Pro), ciclo(L-His-L-Pro) y ciclo(L-Pro-L-Tyr) muestran

similitudes estructurales con péptidos de señalización endógenos como la hormona liberadora de tirotropina. Más recientemente se ha reportado que *P. aeruginosa* produce ciclo (L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), los cuales presentan propiedades en la estimulación del crecimiento vegetal de *A. thaliana* (Ortiz-Castro et al., 2011; 2013a; 2013b; 2014).

Otras actividades biológicas observadas son necrosis en plantas, en donde el ciclodipeptido ciclo(Pro-Tyr) producido por el hongo *Alternaria alternata* un patógeno de *Centaurea maculosa* causa lesiones necróticas en las hojas de la planta, el mecanismo de acción por el cual actúa es debido a que se asocia con un receptor proteico citoplasmático (Park, S.H., et al 1994).

Por otra parte, en especies de *Psychrobacter* se aislaron un total de 16 dicetopiperazinas de las cuales solo el ciclo (L-Phe-L-Pro) indujo citotoxicidad en células epiteliales intestinales de humano (Li, H., et al., 2008- from a marine sponge). Además de las actividades ya mencionadas 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).

Se reportó que los ciclodipeptidos ciclo(Phe-Pro), ciclo(Tyr-Pro) y ciclo(Trp-Trp) en células de carcinoma de colon (HT-29) incrementan la expresión de marcadores bioquímicos retardando el crecimiento de éstas células (Milne et al., 1998). Graz et al, 2000 observó la habilidad de los CDPs para inducir la diferenciación de células neoplásicas a células no neoplásicas, teniéndose la rápida recuperación de éstas células a través de la acetilación de histonas y la fosforilación. El estudio de los CDPs como potenciales agentes anticancerosos es un campo prometedor de estudio por el hecho de que se ha reportado muchos otros CDPs con potencial anticanceroso

Recientemente Vázquez-Rivera et al en el 2015 reportaron que la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* promueven apoptosis en las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2 de manera dosis dependiente, con una concentración inhibitoria 50% (IC50) de 0.53 y 0.66 mg/mL respectivamente, aunque se desconoce el/los blancos moleculares por los cuales inducen a apoptosis en células de mamíferos.

Además de la estructura rígida y quiral de los ciclodipéptidos, éstos se unen a una amplia variedad de receptores con una alta afinidad brindando un amplio rango de actividades biológicas, por lo tanto, el estudio de ciclodipéptidos naturales y sintéticos contribuye a entender los requerimientos estructurales de las interacciones con los diversos receptores biológicos permitiendo la validación de blancos moleculares para así abrir nuevas perspectivas para el descubrimiento de nuevos fármacos. En éste contexto se tiene que la plinabulina, un derivado semisintético del ciclo (*L*-Phe-*L*-His) es un fármaco anticanceroso en fase II, actuando como agente inhibidor de la polimerización de los microtúbulos (Yoshiki Hayashi, et al.,2014).

El aislamiento, síntesis y caracterización estructural de las 2,5-dicetopiperazinas son de vital importancia para poder ser utilizados como posibles fármacos.

1.1.6.1 Quiralidad de los ciclodipéptidos y su relación con la actividad biológica

La quiralidad es una propiedad netamente geométrica: un objeto es quiral cuando no es superponible con su imagen en el espejo, y es *quiral* cuando sí lo es. La quiralidad en muchas moléculas es el resultado de la presencia de un carbono tetraédrico con 4 sustituyentes diferentes. (R.S. Cahn, et al; 1956).

Los aspectos más generales que definen la estructura molecular son tres:

1.-*La constitución*, que se refiere a la clase de átomos que forman parte de la molécula; por ejemplo, 2 carbonos, 6 hidrógenos y 1 oxígeno en la molécula de etanol.

2.-*La conectividad*, que describe cómo están unidos los átomos entre sí. Así, aunque la molécula del éter metílico consta también de los mismos tipos de átomos que constituyen al etanol, la manera en que dichos átomos están unidos es distinta. El etanol y el éter metílico son isómeros ya que muestran la misma constitución pero difieren en la forma en que sus átomos constituyentes están enlazados entre sí.

3.- *La configuración.* La configuración de una molécula de constitución definida se refiere al arreglo en el espacio de sus átomos. Con trabajos de Pasteur (1848) con los ácidos tartáricos, que presentan misma constitución y conectividad pero distintas estructuras químicas, esto es debido a que las moléculas que presentan asimetría, lo hacen debido a que poseen átomos de carbono sustituidos con cuatro ligandos diferentes y orientados a las esquinas de un tetraedro, en cuyo centro está situado el átomo de carbono, como se muestra en la figura 2 (H. F. Kalff, et al, 1966; R. O. Hutchins, et al, 1969).

Así mismo, las estructuras representadas en figura 2 guardan una relación de imágenes en un espejo, que es la misma situación que presentan una mano derecha y una mano izquierda. Con base en ésta analogía, se dice que las moléculas de la figura 2 son quirales (de quiros= mano, en griego), y que los carbonos responsables de la asimetría son centros de quiralidad ó átomos estereogénicos (Eusebio Juaristi, INTRODUCCION A LA ESTEREOQUIMICA Y AL ANALISIS CONFORMACIONAL, 2010). Así pues, la existencia de dos formas isoméricas se explica fácilmente con base en la distinta distribución tridimensional (distinta estereoquímica) de los átomos que la constituyen.

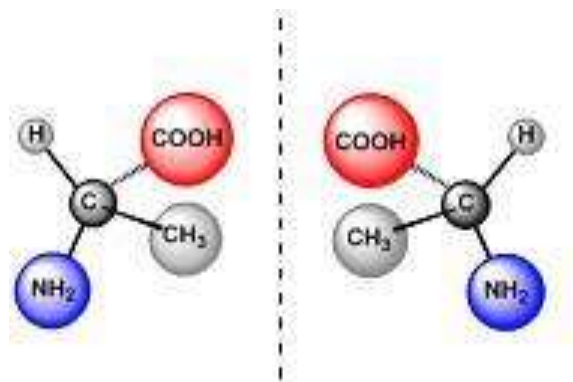


Figura 5.-Quiralidad de una molécula. Puede apreciarse, que la molécula es asimétrica y puede existir en dos formas no superponibles y por lo tanto isoméricas.

Otro ejemplo de importancia es el expuesto en la figura 6, donde las moléculas del ácido láctico (*d* y *l*) difieren en configuración, es decir en la orientación en el espacio de los sustituyentes alrededor del centro de quiralidad, y guardan una relación de imágenes en el espejo; a los pares de moléculas con éstas características se les conoce como *enantiómeros*.

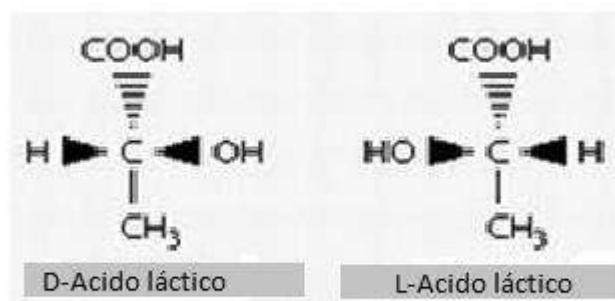


Figura 6.- Enantiómeros del ácido láctico (*d*- y *l*-).

Las moléculas enantioméricas muestran idénticas propiedades físicas (punto de fusión, índice de refracción, acidez, etc.) y termodinámicas (energía libre, entropía, entalpía, etc.) excepto en ambientes asimétricos (actividad óptica, dicroísmo circular, dispersión rotatoria óptica, etc.) (H. F. Kalf, et al 1966; D. J. Pasto, et al, 1969).

1.1.6.2 Determinación de la configuración absoluta en compuestos quirales

La determinación de la configuración absoluta de cualquier molécula quiral no fue posible sino hasta 1951, cuando desarrollaron modificaciones a las técnicas de rayos X con el objeto de dar profundidad a los patrones fotográficos empleados en éste método (J. M. Bijvoet, et al., 1951).

Específicamente, las placas de interferencia que se obtienen después de la difracción de rayos X sobre una molécula, reflejan la diferencia entre los caminos recorridos antes de incidir en la placa

fotográfica. El método empleado por Bijvoet consiste en usar rayos X cuya longitud de onda coincide parcialmente con el espectro de absorción del átomo estereogénico.

En 1891, Fisher propuso que los átomos estereogénicos con cuatro sustituyentes diferentes entre sí, se trazaran de manera que el carbono central (átomo estereogénico) quedara en el plano del papel, los dos sustituyentes a la izquierda y a la derecha indicando hacia delante del plano del papel, y los grupos arriba y abajo, indicando atrás del plano (E. Fisher, Ver, 1891). De acuerdo con ésta convención, la cadena principal de átomos de carbono se dispone verticalmente y de manera que el átomo de carbono en el estado de oxidación más alto quede situado en el extremo superior, ahora sí al colocar los sustituyentes H y X, X queda a la derecha, entonces dicha configuración se denomina D. Cuando por el contrario X queda a la izquierda, entonces dicha configuración se denomina L.

Un método más general de nomenclatura fue el propuesto por Cahn, Ingold y Prelog donde propusieron el sistema R/S de nomenclatura, que ha sido exitosamente adoptado por la comunidad científica. En este método, se asigna una prioridad (el de mayor número atómico) a cada uno de los cuatro sustituyentes en torno al átomo estereogénico, una vez hecho esto, la molécula se ve desde el lado opuesto al grupo de menor prioridad y entonces se observa en qué dirección se pasa del grupo de mayor prioridad al segundo y al tercero. Si dicha dirección es en el mismo sentido que el movimiento de las manecillas del reloj, tal secuencia (configuración) es R (del latín *rectus*= derecha). En cambio cuando el sentido de la secuencia es opuesto al de las manecillas, tal configuración es S (del latín *sinister*= izquierda) (R. S. Cahn, et al., 1956).

Debe notarse que no existe ninguna relación entre la configuración absoluta (D, L ó R, S) y el signo de la rotación óptica (+, -).

Los procedimientos clásicos para la determinación de la estereoquímica absoluta de una molécula normalmente involucran bastantes reacciones y son muy laboriosas. Sin embargo, una asignación confiable de la configuración absoluta es muchas veces factible mediante técnicas que analizan

algunas propiedades quirópticas de las sustancias quirales. En donde la actividad óptica de las moléculas asimétricas se convirtió en una importante herramienta de análisis (E. U. Condon, et al., 1937).

Haciendo uso del fenómeno de la rotación óptica y de la luz polarizada en un plano se tiene que, la interacción entre los electrones de una molécula con el componente eléctrico de la luz produce desviaciones en el plano de la luz polarizada, lo que causa una rotación (actividad óptica) (J.H. Brewster, et al., 1967).

En el caso de moléculas aquirales no se producen éste tipo de desviaciones. Puede apreciarse (Figura 5. Pag 44) también que las moléculas con dos centros de quiralidad opuesta, en los que los cuatro sustituyentes son los mismos, tampoco presentan rotación óptica pues la desviación del plano de luz polarizada causada por la mitad dextrógira (+) en la molécula se ve compensada por la desviación en la segunda mitad (-). Es de suma importancia señalar que α , el ángulo de rotación observado, es proporcional al número de moléculas ópticamente activas que se encuentran en la trayectoria del haz de luz (A. S. Treitwieser y C. Heathcock, Introduction to organic chemistry, 1981).

Los ciclodipéptidos son moléculas quirales con dos carbonos estereogénicos, por lo tanto, las configuraciones absolutas de los dos aminoácidos constituidos en los ciclodipéptidos son de gran importancia, existiendo tres posibilidades enantioméricas (LL, DD Y DL). Un ejemplo de la importancia de la estereoquímica de los ciclodipéptidos es que el ciclo(D-Trp-L-Trp) que ha sido aislado de *Penicillium fellutanum* y nombrado felutanina A, el cual mostró ser activo en contra de cepas multiresistentes a fármacos, como *Acinetobacter baumannii* (Kozlovsky, et al., 2000).

Algunos de los ciclodipéptidos reportados que interfieren en el sistema quorum sensing entran en conflicto, ya que se reportan las mismas moléculas (CDPs) actuando como agonistas así como antagonistas, atribuyéndose éste efecto a que la diversidad estereoquímica de éstas moléculas es muy amplia (Estrela, et al., 2009). La actividad estructural y comparación entre estereoisómeros

han revelado que los D-aminoácidos son necesarios para ser bioactivos, aunque, diversas combinaciones de D- y L-aminoácidos muestran ser más activos biológicamente que los D,D- y L,L-enantiómeros (Fdhila, et al., 2003).

	L-Leu	L-Phe	L-Pro	D-Pro	D-cis-OH-Pro	L-trans-OH-Pro	D-trans-OH-Pro	D-Trp	L-Tyr	L-Val	D-Val
D-Ala										76	
L-Arg			42	41						11	
Gly		63	6						64	65	
L-His			43								
L-Iso			74								
D-Iso				18							
L-Leu	2		4			9				73	
D-Leu				16			13				
L-Phe			5	20	14	10					
D-Phe			1	15			19				
L-Pro			7						44	8	
D-Pro									66		17
L-Val						70	68				
L-Trp			79					12			
L-Tyr						69	67		3		

Tabla 1. Composición de dicetopiperazinas antimicrobianas naturales. Se observa la sobrerrepresentación de D- y -L derivados de prolina. Se ha reportado una sobre representación de Prolina en los ciclodipéptidos, tanto en su forma D y L-Prolina, los cuales tienen actividad biológica como antimicrobianos (Carvalho, et al., 2012).

También se tiene que los efectos citotóxicos de los enantiómeros del ciclo (*L*-Phe-*L*-His) aislado de *Aspergillus ustus* en células de leucemia P388, resultando que solamente la (-)-(S)-fenilhistidina induce citotoxicidad, inhibiendo la progresión del ciclo celular en la fase G2/M, no así con su enantiómero (+)-(R)- fenilhistidina (Kaneo, et al., 1999), indicando que la estereoquímica del carbono alfa de la fenilalanina es importante para la actividad citotóxica.

Cepas bacterianas de *Pecten maximus* producen DD-dicetopiperazinas las cuales tienen actividad antibacteriana (MIC 0.03-0.07 mg/mL) contra el patógeno *Vibrio anguillarum*, ésta actividad inhibitoria depende de la estereoquímica de los componentes ya que sólo éstos isómeros DD tuvieron actividad inhibitoria (Fdhila, F, et al., 2003).

Gracias al amplio espectro de actividades biológicas reportadas para los ciclodipeptidos producidos por diversos microorganismos los hace ver como una nueva generación de agentes farmacológicos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

Debido a que la mayoría de los tratamientos convencionales para el cáncer radica en utilizar agentes citotóxicos, los cuales son no específicos para las célula cancerosa, lo que desencadena un estado de citotoxicidad sistémica, resultando indeseables efectos adversos, como alopecia, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y supresión del sistema inmunitario, el fármaco ideal para el tratamiento contra el cáncer sería el que erradique la célula cancerosa sin afectar el tejido normal, además de que no pueda invadir los mecanismos de resistencia al fármaco. (Jaracz et al., 2005)

Por la falta de fármacos disponibles con los criterios antes mencionados, y la continua elucidación de mecanismos bioquímicos que contribuyan a la progresión del tumor, la búsqueda de novedosos fármacos para terapia contra el cáncer es una necesidad. La identificación y validación de blancos farmacéuticos es el punto de inicio para el desarrollo de fármacos activos que ataquen un blanco celular en particular. La función de muchos péptidos y proteínas han sido identificados como novedosos blancos en la terapia contra el cáncer, permitiendo el diseño de agentes más selectivos (Chauhan et al., 2005).

1.2 Generalidades del cáncer

Según el Instituto Nacional del Cáncer, la palabra “cáncer” es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas, que se caracterizan por la división rápida de células anormales, que tienen la capacidad de propagarse e invadir otros tejidos (NIH, 2015).

El cáncer es causado por alteraciones en la expresión de un grupo de genes, por lo tanto también se considera que el cáncer es una enfermedad genética compleja causada principalmente por factores ambientales que producen mutaciones que afectan a genes implicados en el crecimiento y proliferación (Malcolm R Alison, 2001). Se reportó por primera vez por Srinivasan y Borek en

1964 que en algunos casos el cáncer también puede ser desencadenado por modificaciones epigenéticas.

Debido a que el cáncer es una enfermedad muy compleja que presenta una gran variedad de alteraciones en múltiples genes es lógico encontrar que se han observado mutaciones en unos 500 genes en tumores humanos, lo que supone casi el 2% de los genes del genoma humano (Tung, et al., 2016).

A pesar de la gran diversidad y plasticidad de las células cancerosas, se han establecido una serie de características distintivas comunes a todos los tipos de cáncer, las llamadas “características” del cáncer, que se definen como capacidades que van adquiriendo las células a medida que evolucionan desde células normales a células tumorales (Figura 5), las cuales en conjunto constituyen un principio de organización celular; cada uno de estos cambios fisiológicos representa un mecanismo de defensa exitoso para el cáncer (Hanahan, et al., 2011).

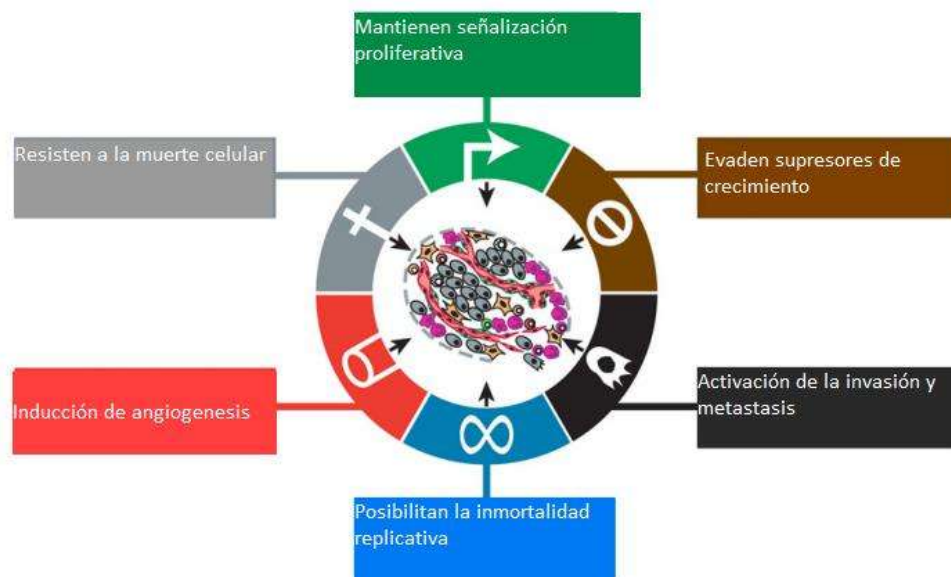


Figura 7. Características del cáncer. Capacidades distintivas y complementarias que permiten el desarrollo del cáncer (Modificada de Hanahan, et al., 2011).

1.2.1 La célula cancerosa

La membrana de la célula es de vital importancia, ya que la terapia contra el cáncer está basada en que ciertos fármacos matan a las células cancerosas preferencialmente que a las células normales, esto es, debido en gran parte a las peculiares características de la superficie celular de las células cancerosas, así como a la liberación localizada de agentes citotóxicos a células cancerosas. (Spitz et al., 2000).

Los cambios moleculares de la superficie celular son capaces de influir en la evolución del cáncer, ya que recaen en la modificación de proteínas e hidratos de carbono que actúan como enzimas y receptores de la superficie celular cancerosa. Las principales modificaciones son, incremento ó disminución del número de receptores de la superficie, produciendo un cambio en la sensibilidad celular para regular mecanismos del huésped y cambios estructurales de las proteínas presentes en la superficie celular, evitándose la correcta reacción con su correspondiente ligando, por lo que se ven afectadas las vías de señalización (Baba, Comparative oncology, 2007).

Además de la participación de las proteínas en la superficie de la célula cancerosa, éstas constituyen un componente esencial del citoesqueleto de la célula, por lo que proteínas alteradas estructuralmente cambian la habilidad de las células cancerosas influenciando sus mecanismos de deformación. Como resultado, su motilidad es muy diferente a las células normales, causando una mejor movilidad de las células contribuyendo a la progresión del cáncer. Aunado a esto, el decremento de retículo endoplásmico granular en células cancerosas ocurre junto con un incremento de ribosomas y polisomas libres, los cuales incrementan la producción de proteínas necesarias para el proceso de crecimiento celular (Suresh et al., 2007).

Otra característica importante de la célula cancerosa es su capacidad de evadir mecanismos del sistema inmune, logrando así sobrevivir a un microambiente de inflamación crónica, evitar el reconocimiento inmune y suprimir la respuesta inmune celular. (Hanahan y Weinberg, 2000).

Después de que el cáncer fue reconocido como una enfermedad basada en la célula, muchos esfuerzos científicos se llevaron a cabo para entender el proceso involucrado en la génesis de las células anormales, fue entonces cuando se sugirió que las células cancerosas contenían una distribución anormal de genes (Boveri et al,2008).

1.2.2 Genes asociados al cáncer

En la aparición del cáncer, se han implicado mutaciones en tres amplias clases de genes, los cuales son genes supresores de tumores, protooncogenes y los genes de estabilidad (Vogelstein et al.,2004;Cullen,2002).

Los protooncogenes son aquellos genes que se encargan de la proliferación celular normal, que cuando ocurre una o varias mutaciones, estos genes son convertidos en oncogenes (Campbell et al.,2007).

Los genes supresores de tumores son aquellos que regulan de forma negativa la proliferación celular, por lo que si se dañan se produce un crecimiento inapropiado. El gen TP53, es un gen supresor de tumores que cuando hay daño en el ADN promueve la síntesis de proteínas que inhiben el ciclo celular, en caso de que el daño a l ADN sea irreparable se activa el proceso de apoptosis (Campbell et al., 2007).

Los genes de estabilidad son aquellos encargados de corregir los posibles errores producidos en la replicación y de reparar las alteraciones producidas por cualquier agente mutagénico, además de que están involucrados en procesos como la segregación cromosomal. Si alguno de estos genes no funciona, aparecen múltiples mutaciones en el genoma que acaban afectando a los dos tipos anteriores, desencadenando procesos tumorales (Wood et al., 2001;Vogelstein et al.,2004).

Desde hace décadas se han venido usando diferentes líneas celulares cancerosas como modelos para el estudio y desarrollo de terapias antitumorales. El uso de estas líneas celulares presenta una serie de ventajas, como la homogeneidad de las muestras y el control de las condiciones ambientales.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en muchos países, según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia mundial del cáncer se estima en el 50%, con 15 millones de casos nuevos en el año 2020. Los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia en México, son: el cáncer cervicouterino, el cáncer colorrectal, el cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de próstata (Knaul et al., 2009); (GLOBOCAN, 2012).

1.2.3Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino es el tipo de cáncer que ocupa el cuarto lugar de causa de muerte en mujeres en el mundo (Llaguno et al, 2016). En México, entre el periodo comprendido en los años 2000 al 2010, se reportaron 82090 nuevos de casos de cáncer cérvico-uterino, dentro de los cuales se registraron 46173 muertes (Anaya-Ruiz et al., 2014).

Los principales factores de riesgo para desarrollar el cáncer cérvico-uterino son la transmisión del virus del papiloma humano y tener un sistema inmunológico incompetente (Chelimo et al., 2013; Stanley et al, 2006)

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 (Guan, et al., 2012).

1.2.4 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres y el segundo en mujeres en países desarrollados. Se estima que en el 2012, en México hubieron 8,651 casos de cáncer colorrectal y se prevee que en el 2015 este número aumentará hasta llegar a 9,554 casos (GLOBOCAN, 2012).

A nivel genético, las células CaCo-2 presentan alteraciones típicas de los tumores colorrectales, como son mutaciones en APC y p53 con la consiguiente pérdida de sus funciones, amplificación de c-myc, y un fenotipo de aneuploidia e inestabilidad cromosómica, resultando en cáncer invasivo (Arlt et al., 2009).

Una de las líneas celulares empleadas como modelo de estudio para este tipo de cáncer 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).

1.2.5 Tipos de muerte celular

Es de suma importancia caracterizar las vías involucradas en la muerte celular para poder entender las patologías que se presentan en la enfermedad del cáncer. Existen dos principales mecanismos de muerte celular necrosis y apoptosis. Aunque, en realidad, el espectro biológico de tipos de muertes es mucho más diverso.

La necrosis es un tipo de muerte en el que está altamente regulado por factores ambientales externos a las células. Autofagia, otro tipo de muerte celular, involucra la degradación de componentes intracelulares dentro de vacuolas. Piroptosis es la vía de muerte celular con características inherentes a la inflamación del tejido. Por último la apoptosis es un tipo de muerte altamente regulado, mediado por caspasas con particulares características morfológicas sin la participación de moléculas antiinflamatorias (Fink et al., 2005).

1.2.5.1 Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular resultante de perturbaciones ambientales, se refiere a un proceso degradativo en el que la célula sufre cambios morfológicos como son formación de vacuolas citoplasmáticas, ruptura de la mitocondria, disgregación de los ribosomas y ruptura de los

lisosomas con la posterior ruptura de la membrana celular. Ésta pérdida de integridad de la membrana hace que se libere el contenido citoplasmático a la células vecinas, con lo que eventualmente se desencadena respuesta inflamatoria en el tejido (Elmore, 2007).

1.2.5.2 Necroptosis

Este tipo de muerte celular es un híbrido que comparte aspectos de la necrosis y la apoptosis. Desde el punto de vista morfológico se asemeja a la necrosis, ya que ambas se caracterizan por edema de la célula y los organelos, liberación de enzimas lisosómicas y, en último término, rotura de la membrana plasmática. El proceso de necroptosis se inicia de manera similar a la forma extrínseca de apoptosis, es decir, por la unión a su receptor de un ligando (TNFR1) (Holler et al 2000). En la necroptosis intervienen al menos dos cinasas, llamadas cinasas asociadas a receptores 1 y 3 (RIP1 Y RIP3) las cuales son reclutadas por el TNFR1 desencadenándose la permeabilización de membranas lisosómicas, generación de especies reactivas de oxígeno y afectación mitocondrial (Christofferson et al., 2010).

1.2.5.3 Autofagia

El término autofagia fue 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. En estados de carencia de nutrientes, la célula desnutrida sobrevive canibalizándose a sí misma y reciclando el contenido digerido. La autofagia interviene en diversos estados fisiológicos (p. ej., ejercicio y envejecimiento) y procesos patológicos (Chen et al., 2016). En éste proceso, los organelos intracelulares y porciones del citosol son primeramente secuestrados del citoplasma en una vacuola autofágica formada por regiones del retículo endoplásmico rugoso libres de ribosomas, hay una elongación de la vesícula, maduración del autofagosoma, fusión de este con los lisosomas y por ultimo degradación del contenido. Se han identificado más de una docena de genes relacionados con la autofagia, llamados Atg, cuyos productos son necesarios para formar el autofagosoma (Edinger et al., 2004; Yao et al., 2015).

1.2.5.4 Piroptosis

Piroptosis es muerte celular programada proinflamatoria la cual depende de la caspasa 1. La caspasa 1 no esta involucrada en muerte celular apoptotica. Una función importante de la caspasa 1 es que procesa las proformas de citosinas inflamatorias IL-1 β y IL-18 a sus formas activas (Maltez et al., 2015). A diferencia de la apoptosis que inhibe la respuesta inflamatoria. La participación de la caspasa 1 durante la muerte celular en el sistema nervioso central y sistema cardiovascular indica que la piroptosis participa en una variedad de sistemas biológicos (Cookson et al., 2001; Liu et al., 1999; Fink et al., 2005).

1.2.5.5 Apoptosis

Kerr et al. En 1972 propusieron el término “apoptosis”(en griego “caída de hojas”), que se refiere al carácter “secuencial y ordenado” de este proceso, para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular, con características bioquímicas y genéticas específicas (Kerr et al., 1972).

La muerte por apoptosis es un proceso homeostático fundamental para mantener regulada la población de células en los tejidos. Asimismo, ocurre cuando las células están dañadas sin remisión, especialmente cuando el daño afecta a su DNA (Hengartner et al 1994). Existe 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, 2002).

Desde el punto de vista morfológico, las células apoptóticas se caracterizan por la contracción celular, la ruptura de las uniones celulares por desmosomas, el incremento de la condensación del citoplasma, aparecen pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana que se denominan blebs, la condensación de la cromatina en la periferia del núcleo, la posterior fragmentación del mismo, el hinchamiento del retículo endoplasmático y de las mitocondrias y, finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos, de esta manera son eliminados del tejido, sin causar una respuesta inflamatoria. Estos cambios morfológicos son una

consecuencia de los eventos bioquímicos que ocurren dentro de una célula apoptótica (Kurosaka et al., 2003; Evan, et al., 1998).

Las características bioquímicas más destacadas de la apoptosis son: la activación de unas proteasas denominadas caspasas, la ruptura de ADN en fragmentos oligonucleosomales, el desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico, generación de radicales libres, la disminución del potencial de membrana mitocondrial y la pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática, exponiéndose la fosfatidilserina en la superficie celular (Hengartner et al., 2000).

El punto de no regreso en la apoptosis es cuando las caspasas comienzan a ser enzimáticamente activas uniéndose a sus proteínas blanco (las ejecutoras de la apoptosis) (Hengartner et al., 2000).

Los mecanismos de apoptosis son altamente complejos y sofisticados, que involucran una cascada de eventos moleculares que son dependientes de energía. Existen dos principales vías de apoptosis: La vía extrínseca o vía de receptores de muerte y la vía intrínseca o vía mitocondrial (Elmore, 2007). Sin embargo las dos vías están ligadas y las moléculas en una vía pueden influenciar a otras (Igney et al., 2002).

1.2.5.5.1 Caspasas

Las caspasas (proteasas específicas de aspartato dependiente de cisteína) son una familia de proteasas que contienen cisteína en sus sitios activos. Desde el descubrimiento de la primera caspasa en 1993, al menos se han descubierto 10 caspasas identificadas en humanos. Todas las caspasas se unen específicamente justo en el carbono terminal del ácido aspártico. Además de que en la célula existen en forma de zimógenos que necesitan activación proteolítica para desencadenar la apoptosis una vez que la activación de las caspasas ha ocurrido (Fisher et al., 1994).

Las diez caspasas humanas identificadas 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). Las caspasas efectoras (-3, -6, -7) tienen un pro dominio corto y las caspasas inflamatorias (1, 4, 5) (Cohen, 1997).

Se considera que la caspasa efectora 3 es la más importante, ya que activa específicamente la endonucleasa CAD. En células normales CAD se encuentra en complejo con su inhibidor ICAD. En células apoptóticas, la caspasa 3 en su forma activa se une a ICAD liberando a CAD. Posteriormente, CAD degrada el ADN cromosomal y causa condensación de cromatina (Sakahira et al., 1998). La caspasa 3 también induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula a cuerpos apoptóticos Gelsolin es una proteína de unión a actina y ha sido identificada como uno de los sustratos claves de la caspasa 3 (Elmore et al., 2007).

Las Caspasas son consideradas las responsables de ejecutar la muerte celular programada (apoptosis) (Strasser et al.,2000). La iniciación de la apoptosis puede ser por consecuencia de la alteración de la membrana mitocondrial, en cuyo caso estaremos ante la llamada vía intrínseca, o bien originarse por la unión de determinados ligandos a receptores de la superficie celular, la llamada vía extrínseca. Ambas vías convergen en la activación de caspasas (Ichim et al., 2016).

1.2.5.5.2 Vía extrínseca ó mediada por receptor

La vía extrínseca de la apoptosis, se origina cuando uno de los receptores pertenecientes a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) una superfamilia de genes que incluyen FAS/CD95, TNF-R1, DR-3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR-6, EDA-R, DF-5 y p75NTR los llamados “receptores de muerte” denominados genéricamente receptores de muerte (DR). En ellos diferenciamos dominios extracelulares con motivos ricos en cisteína, una región transmembrana y una cola intracitoplasmática en la que destaca el dominio de muerte (DD) que le permite reconocer a su ligando con especificidad, dando como resultado la trimerización y activación del respectivo receptor de muerte (Naismith et al., 1998; Ashkenazi, 2002). Esta unión, conlleva la interacción de los DD con otros dominios DD presentes en proteínas adaptadoras como FADD/MORT1 O TRADD (Chinnaiyan et al., 1995; Hsu et al., 1995). Estas proteínas adaptadoras presentan a su vez dominios efectoros de muerte (DED) que interaccionan con los DED de la procaspasa 8, generándose un complejo multimerico denominado complejo de la señal inductora de muerte (DISC), que

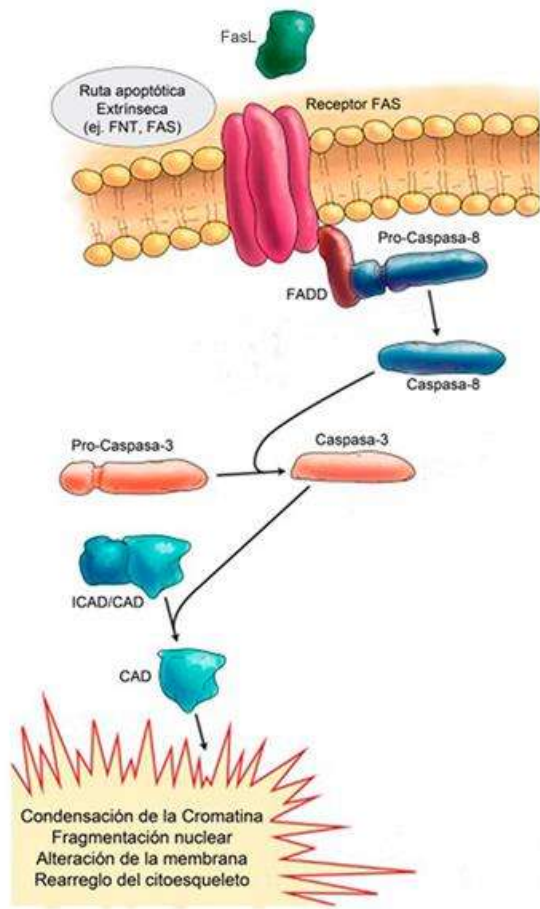
permite la activación de la procaspasa y desencadena el comienzo de la apoptosis. Ésta última a su vez, procesa la caspasa efectora 3 la cual subsecuentemente ejecuta la muerte celular y sus características bioquímicas usualmente observadas (**Figura 8**) (Kischkel et al., 1995).

1.2.5.5.3 Vía intrínseca o mediada por mitocondria

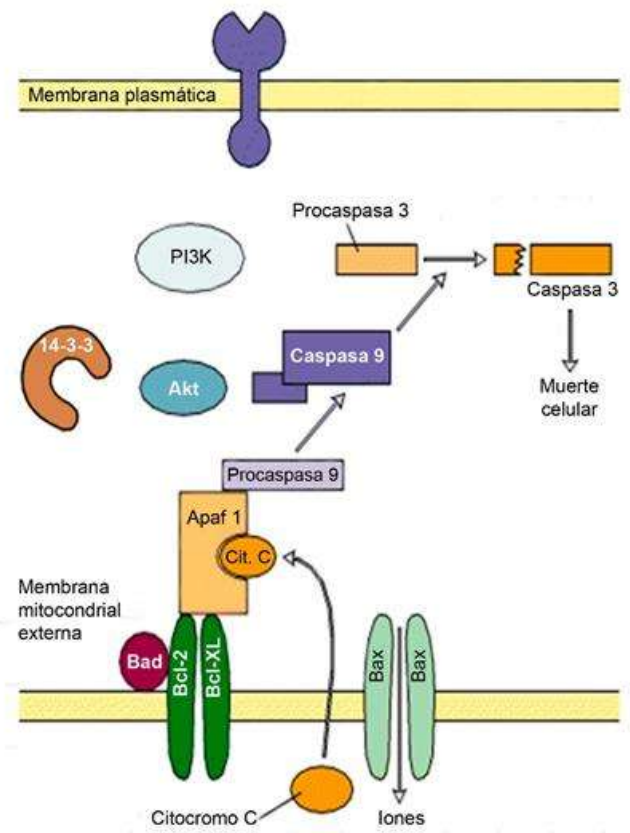
En respuesta a señales apoptóticas, los miembros de la familia Bcl-2 alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Estas proteínas son capaces de formar canales en la membrana mitocondrial externa, produciendo cambios en el potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y producción de especies reactivas de oxígeno (Salvensen et al., 2002).

La vía intrínseca ó mediada por mitocondria puede desencadenarse por varios factores como el daño al ADN, la hipoxia o la privación de factores de crecimiento, y en ella la mitocondria desempeña un papel crucial. Estos desencadenantes modifican el equilibrio entre miembros proapoptóticos (Bax ó Bak) y antiapoptóticos (Bcl-2 ó Bcl-x), se altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial y se liberan diversos factores proapoptóticos como citocromo c, por lo que la proteína activadora de caspasas Apaf-1 se une al citocromo c y, en presencia de ATP o dATP, promueve la activación de la procaspasa 9 lo que desencadena la activación de otras caspasas efectoras como la caspasa 3. Entre otros sustratos de la caspasa 3 se encuentra ICAD, un inhibidor de la endonucleasa CAD (Enari et al., 1998) que al liberarse de la enzima propicia la actuación de ésta y por tanto la ruptura interoligonucleosómica del ADN.

Además ésta vía involucra a la procaspasa 9, la cual es activada por eventos proapoptóticos mitocondriales que forman el apoptosoma, el cual es un complejo proteico de señal de muerte dependiente de ATP, que se forma en el citosol debido a la liberación de Citocromo C desde el espacio intermembranal de la membrana mitocondrial (Salvensen et al., 2002). En este caso, es la dimerización de la procaspasa- 9 en este complejo que da como resultado la activación de la caspasa-9 (Denault et al., 2002). Una vez que la caspasa iniciadora es activada, puede activar proteolíticamente a caspasas efectoras como procaspasa -3, la cual subsecuentemente proteoliza a diferentes sustratos proteicos, incluyendo a las mismas procaspasas, de esta manera amplifican la señal de muerte que finaliza con la ejecución de la muerte celular y sus características bioquímicas usualmente observadas (Earnshaw et al., 1999).



VIA EXTRINSECA



VIA INTRINSECA

Figura 8. Vías de inducción de apoptosis. Via 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. Via intrínseca: En ausencia de un factor trofico, se inhibe la actividad cinasa de PI3K, que conduce a la inactivación de la cinasa Akt corriente abajo, que a su vez inactiva a Bad evitándose la formación del complejo con la proteína 14-3-3, por lo que Bad se une a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, insertas en la membrana mitocondrial. La unión de Bad impide que las proteínas antiapoptóticas interactúen con Bax, una proteína proapoptótica unida a la membrana. Como consecuencia, Bax forma canales permitiendo la liberación de citocromo c al citosol, donde se une a la proteína adaptadora Apaf-1 estimulando la cascada de caspasas e induciendo muerte celular. (difi-cado de Marzban, *et al* 2015; Pettman *et al* 1998).

1.2.5.5.4 La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR implicada en el cáncer

Existen muchas vías que cuando son desreguladas pueden inducir proliferación celular descontrolada.

La vía de señalización 3-fosfoinositol-cinasa (PI3-K)/Akt es la vía de supervivencia celular mejor conocida. Activada por diversos estímulos y señales externas, ésta vía regula muchas funciones celulares clave como proliferación, crecimiento, transcripción, traducción, ciclo celular y apoptosis (Cantley et al., 2002; Maddika et al., 2007). Notablemente, la vía de señalización PI3-K/Akt se encuentra frecuentemente alterada en muchos tipos de cáncer humanos y juega un papel importante, no sólo en el desarrollo del cáncer, también en respuesta al tratamiento del cáncer (Vivanco et al., 2002). Existen varios enfoques terapéuticos basados en vías de señalización de supervivencia incluyendo la vía PI3-K/Akt.

Los blancos de Akt en el contexto de su acción como antiapoptótico son Bad (miembro apoptótico de la familia Bcl2), caspasa 9, MDM2 (regulador negativo de p53). Cuando Bad es fosforilado por Akt en Ser-136, éste forma un complejo con la proteína 14-3-3, evitándose la interacción con los miembros de la familia antiapoptótica Bcl-2 como Bcl-xL (Datta et al., 1997). La fosforilación de la caspasa 9 en Ser-196 causa la inhibición de su actividad proteolítica (Cardone et al., 1998).

La sobreexpresión de Akt confiere supervivencia celular, y Akt fosforila e inactiva sustratos que están directamente relacionados con la apoptosis, incluyendo la caspasa 9 y Bad. Finalmente Akt puede inhibir la liberación de citocromo c de la mitocondria.

El cáncer es caracterizado por un sostenido crecimiento celular, requiriendo una continua síntesis de proteínas que depende de un suministro constante de ribosomas. El control de la transcripción ribosomal de proteínas está a cargo de la vía Akt-PI3K-mTOR-S6K (Hanahan, et al., 2000).

En la mayoría de los casos de cáncer se han encontrado múltiples alteraciones genéticas que los hacen difíciles de tratar con sólo un tipo de fármaco, dependiendo del mecanismo del efecto anticanceroso los fármacos pueden ser categorizados como citotóxicos y citostáticos. Muchos fármacos han sido investigados para la terapia contra el cáncer, en el que sus blancos de acción incluyen genes, citosinas, anticuerpos y proteínas (Lengauer, et al., 1998).

Las tirosin cinasas están frecuentemente desreguladas en células cancerosas, haciéndolos atractivos blancos terapéuticos. Un ejemplo de ello es el fármaco Wortmannin, un metabolito fúngico, potente inhibidor de PI3-K, el cual es un potente inhibidor de tumores (West et al 2002). Por el hecho de que wortmannin es inestable en soluciones acuosas se necesitan desarrollar derivados más estables. StI571, un inhibidor de Akt, causa desregulación transcripcional de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y c-IAP in vitro (West et al., 2002).

La vía de señalización mTOR regula muchos procesos celulares y está implicada en un gran número de condiciones patológicas, incluyendo cáncer, obesidad, diabetes tipo 2 y neurodegeneración. La activación oncogénica de la señalización de mTOR induce muchos procesos requeridos para el crecimiento, supervivencia y proliferación de células cancerosas debido al incremento de la biogénesis ribosomal relacionada con la activación mTOR. Por lo que se ha generado mucho interés en los blancos moleculares de la vía mTOR para el tratamiento del cáncer. Actualmente se han desarrollado rapalogos a rapamicina aprobados por la FDA Everolimus y Temsirolimus. Aunque debido a la presencia de numerosos actores sobre la activación de mTOR contribuyen a la limitación de la eficacia terapéutica de los rapalogos (Figura 7) (Laplante et al., 2013)..Por lo que se tiene gran interés en desarrollar moléculas que inhiban la actividad cinasa de mTOR ó en su caso buscar otros blancos moleculares que puedan inhibir ésta vía de señalización.

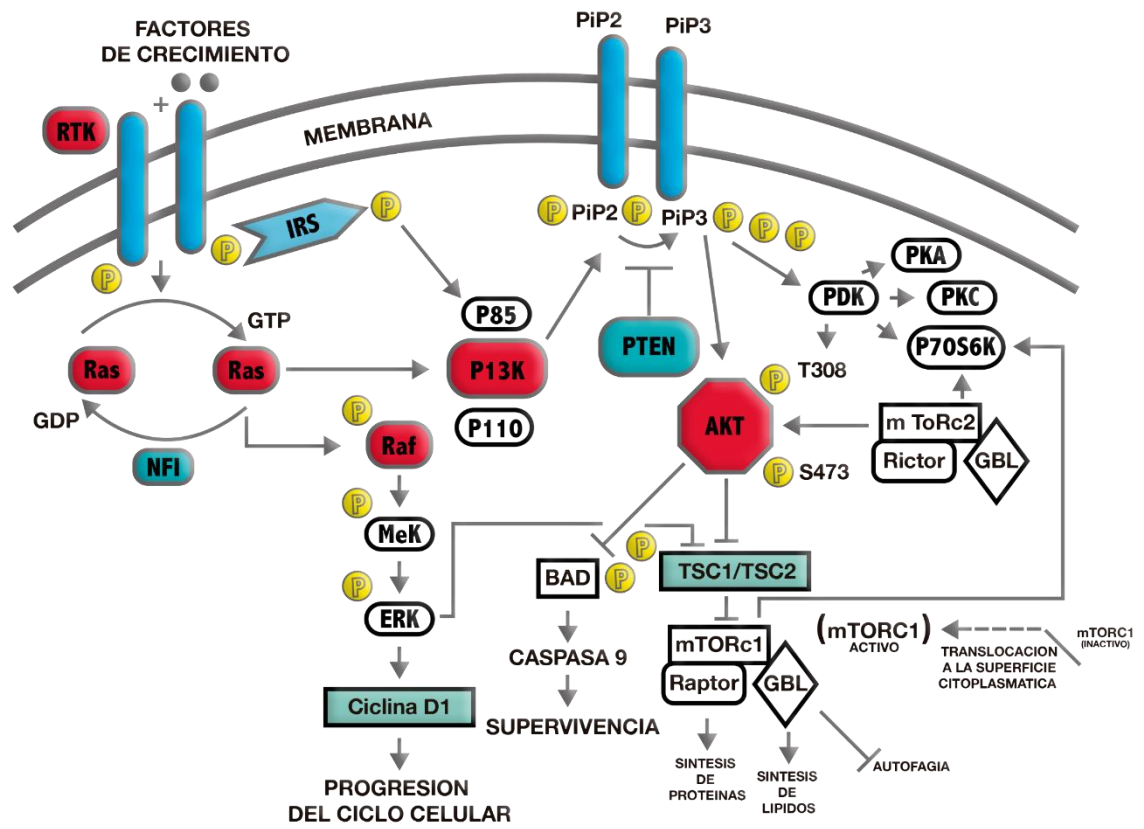


Figura 9. Nodos de señalización clave que regulan la vía mTOR.

2. ANTECEDENTES

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 mamíferos. Anteriormente, 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. 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. Los resultados indicaron que el mecanismo de acción de los CDPs involucra la vía de apoptosis intrínseca.

3. JUSTIFICACION

La mezcla de ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 provocaron efectos citotóxicos en líneas celulares cancerosas humanas HeLa y Caco-2, induciéndolas a apoptosis por la vía intrínseca. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales actúan. Por otro lado, se ha descrito que los CDPs ciclo (Pro-Tyr) y ciclo(Pro-Phe) aislados de especies de *Bacillus* causaron un ligero decremento en la expresión o fosforilación de la proteína-quinasa Akt. Por lo que el mecanismo de inducción de muerte celular por los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 involucra la vía intrínseca de apoptosis en las líneas celulares cancerosas humanas HeLa y CaCo-2, posiblemente mediante la participación de la vía de señalización PI3k/Akt/mTOR.

4. HIPOTESIS

Los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 inducen apoptosis en las líneas celulares cancerosas humanas (HeLa y CaCo-2) a través de la vía de señalización PI3k/Akt/mTOR.

5. OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la vía de señalización involucrada en la respuesta anti-proliferativa de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 sobre las líneas celulares cancerosas humanas HeLa y CaCo-2.

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar el efecto citotóxico de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 que componen la mezcla sobre las LCCH HeLa y CaCo-2.
2. Determinar la participación de la vía de señalización PI3k/Akt/mTOR en el efecto anti-proliferativo de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 sobre las LCCH HeLa y CaCo-2.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Medios de cultivo

- Medio completo. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES . Composición: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES 15.6 gr/L, NaHCO₃ 1.5 gr/L, Penicilina/Estreptomicina 10,000 U/mL de Penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma) 1%, suero fetal bovino (SFB, Sigma) 10%.
- Medio incompleto. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES . Composición: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES 15.6 gr/L, NaHCO₃ 1.5 gr/L

*Se preparan con agua estéril y se les ajusta el pH a 7.4.

- Caldo Luria-Bertani (CLB). Composición: NaCl 0.5%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%. Se utiliza agua destilada en la preparación del medio.
- Agar Luria-Bertani (ALB). Composición: La misma que el agar Luria, excepto que contiene además agar bacteriológico 1.5%.

7.2 Materiales biológicos

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 la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa del CEMB-UMSNH.

7.3 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

7.4 Extracción de ciclodipéptidos

Se preparan 100 mL de medio líquido (CLB) y se inoculan con el aislado bacteriano a extraer (preinóculo), se incuban 12 – 16 horas con movimiento a 37°C, posteriormente se toman del preinóculo 50 mL y se introducen en matraces con 960 mL de medio LB y se incuban por 48 horas a 30 °C con movimiento a 125 rpm. Al finalizar el periodo de incubación las bacterias son removidas por centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, los sobrenadantes son extraídos tres veces por 2 minutos cada una con un volumen igual de acetato de etilo (J.T. Baker) acidificado con ácido acético glacial (J.T. Baker) a una concentración de 0.01%. Se desecha la fase acuosa y las fases orgánicas se colectan en un matraz balón para ser evaporadas a sequedad por evaporación rotativa (Rotavapor, Buchi R-215) a 60 °C. El residuo fue redissuelto en 1 ml de metanol: acetonitrilo 1:1 grado HPLC (J.T. Baker), los extractos se concentran hasta sequedad en vacío (Concentrador Labconco) y se almacenan a 4 °C hasta el momento de su análisis. Para verificar la presencia y pureza de los CDPs se realizó análisis mediante HPLC.

7.5 Purificación de los ciclodipéptidos

La purificación de los CDPs se realizó mediante HPLC, empleando una columna semi-preparativa, bomba series 200 lc pump, Perkin Elmer, detector 785 A Applied Biosystems, interfaz NCI 90, Perkin Elmer a temperatura ambiente con el siguiente método:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	5	90	10
40	5	60	40
10	5	90	10

Tabla 2. Gradiente utilizado en análisis por HPLC para purificación de CDPs. Solvente A: Agua; Solvente B: Acetonitrilo.

Se resuspendió la mezcla de los ciclodipéptidos en 1mL de acetonitrilo y se vortexea, posteriormente se inyectó en el HPLC con la columna semipreparativa y separando empleando el método de la Tabla 2 , utilizando agua y acetonitrilo como fase móvil. Se recuperó el efluente del inyector para después evaporarlo a sequedad y resuspender en acetonitrilo.

Posteriormente se pusieron las fracciones de los ciclodipéptidos colectadas en baño de agua a 50C hasta casi evaporación. Se llevaron al ultracongelador por 1 hr hasta que las fracciones estaban congeladas. Las fracciones fueron liofilizadas hasta que se evaporó el agua que contenían. El residuo fue redisolto en 1 ml de metanol: acetonitrilo 1:1 grado HPLC (J.T. Baker), los extractos se concentran hasta sequedad en vacío (Concentrador Labconco) y se almacenan a 4 °C hasta el momento de su análisis.

7.6 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Las muestras resultantes de la extracción con acetato de etilo y disueltas en acetonitrilo, se analizaron por HPLC (Varian ProStar 335 Diode Array Detector) con un gradiente lineal de H₂O: acetonitrilo a un flujo constante de 0.5 mL/min, usando una columna para cromatografía en fase inversa Agilent Polaris 3C18-A a 50°C. El volumen de muestra inyectada fue de 5µL. Se utilizó las absorbancia de 210 nm en el intervalo del ultravioleta y elución en gradiente con el detector ELITE LaChrom HITACHI UV-VIS L2420. El agua desionizada y el acetonitrilo

grado HPLC fueron filtrados y desgasificados. El agua desionizada fue también acidificada con H₃PO₄ al 0.05%.

Tiempo (min)	Tasa de flujo (mL/min)	% A	% B
0	0.5	100	0
12	0.5	40	60
13	0.5	100	0
15	0.5	100	0

Tabla 3. Gradiente utilizado en análisis por HPLC para análisis de CDPs purificados. Solvente A: Agua; Solvente B: Acetonitrilo.

7.7 Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares HeLa y Caco-2, éstas monocapas se mantuvieron y propagaron en medio completo Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES. Las líneas celulares se sembraban dos veces por semana manteniéndose en incubadora a 37°C y 5% de CO₂. HeLa y CaCo-2 eran colectadas mediante la tripsinización utilizando 3 ml de tripsina durante 2 min a temperatura ambiente seguido de la adición de 3 ml de medio completo para detener la actividad de la tripsina. Después de la tripsinización las células fueron contadas con una cámara hemocitométrica y se sembraban en medio completo F-12 Ham.

7.8 Criopreservación

7.8.1 Congelamiento de células

De células confluentes en caja de 10 ml se despegaron las células con 3 ml de tripsina, al observar el desprendimiento de las células se bloquea la tripsina con 3 ml de medio completo, se recupera

todo el volumen y se centrifugan por 10 min a 1500rpm. Se decanta el líquido y la pastilla de células se resuspenden en solución de suero fetal bovino y DMSO 9:1, la solución debe estar previamente esterilizada por filtración. Se dejaron las células en solución SFB:DMSO 9:1 en hielo durante 1 hr para posteriormente guardarlas a -80°C.

7.8.2 Descongelamiento de células

Para la fase de descongelación de las células HeLa y CaCo-2 se sacaron los viales del revco y se pusieron inmediatamente en hielo, posteriormente se pasó el contenido del vial a 10 ml de medio completo F-12 Ham, se observaron al microscopio y por último se dejan en incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

7.9 Ensayo de viabilidad celular por MTT

Para determinar la toxicidad por el método colorimétrico MTT se cultivaron las líneas celulares HeLa y Caco-2 3×10^4 células por pozo en placas de 96 pozos (Corning) de fondo plano en un volumen de 200 µl de medio completo (CM) e incubando a 37°C y 5% de CO₂. Para sincronizar las células después de 24h se cambió a medio incompleto (desprovisto de suero) y se incubaron por 12h. Posteriormente a las células se les cambió el medio y se estimularon con diferentes concentraciones tanto de la mezcla de los CDPs como de los CDPs purificados (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/mL).

Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs y como control positivo de muerte celular, para todos los ensayos las células se trataron con Actinomicina D (5 mM) (Sigma), un inductor de apoptosis. Para esto, se adicionaron 10µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5 mg/ml) (Sigma), a cada pozo y se dejó actuar durante 4 h. Luego se resuspendieron los cristales de formazan con 100µL de isopropanol-HCL M (19:1 v/v) y después de 30 minutos se leyeron las muestras en un espectrofotómetro para microplacas BioteK Epoch a 595nm, mezclando durante 60s en cada lectura. Los datos fueron recolectados y extraídos con el software Microplate manager (BioteK). Se realizaron 2 ensayos para cada tratamiento con tres repeticiones cada uno.

7.10 Evaluación de apoptosis/necrosis mediante el ensayo de Anexina V/Yoduro de Propidio

Para el ensayo de Anexina V/Yoduro de Propidio se utilizaron las líneas celulares HeLa y CaCo-2. Las células fueron cultivadas y tratadas en cajas de 96 pozos, se sembraron 3×10^4 células en 200 μ L de medio completo a 37°C y 5% de CO₂, al paso de 24h se les cambió a medio incompleto para sincronizar las células, se incubaron por 12h a 37°C y 5% de CO₂ y se aplicaron los tratamientos como se describió anteriormente. Al finalizar el tiempo de incubación con los tratamientos, las células se despegaron con tripsina para luego centrifugarlas a 2,500 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 100 μ L de PBS, repitiendo éste proceso 2 veces. Luego se centrifugó por 10 min a 2,500 rpm a 4°C, se lavó la pastilla con 100 μ L de PBS, se centrifugó y la pastilla se resuspendió con 20 μ L de buffer de unión a Anexina (10 mM de HEPES, 140 Mm NaCl₂, pH 7.4). Se adicionó 1 μ L del conjugado Anexina V (Life technologies) y 1 μ L de yoduro de propidio (1:4) (1mg/mL) (Sigma). Se dejaron incubar las células a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se añadieron 80 μ L de buffer de unión a Anexina V y se mezcló cuidadosamente (las muestras se mantuvieron en hielo). Se analizaron las muestras por citometría de flujo en un citómetro BD Accuri. Para detectar apoptosis se analizó la emisión de fluorescencia en el canal FL1 a 535/617 nm, así como para detectar necrosis se analizó la emisión de fluorescencia en el canal FL2 a 535/617 nm. Se analizó un mínimo de 20,000 eventos celulares.

7.11 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Las muestras resultantes de la extracción con acetato de etilo y disueltas en metanol grado HPLC, se analizaron por CG-EM (Agilent CG System 7890A equipado con un detector de Espectrometría de Masas Agilent MSD 5975C) usando He como gas acarreador a un flujo de 1 ml/min, usando una columna capilar de 30m x 250 μ m x 0.25 mm, con una matriz de 5% de fenil metil siloxano, con una temperatura de detector de 300 °C y una temperatura de inyección de 250°C. El volumen de la muestra inyectada fue de 1 μ L. Se realizó un análisis SCAN para verificar la presencia de ciclodipéptidos con los datos obtenidos de la espectrometría de masas.

7.12 Lisis celular

Se cultivaron las líneas celulares HeLa y Caco-2, 250,000 células por pozo en placas de 6 pozos (Corning) de fondo plano en un volumen de 3ml de medio completo (CM) e incubando a 37°C y 5% de CO₂. Para sincronizar las células después de 24h se cambió a medio incompleto (desprovisto de suero) y se incubaron por 12h. Posteriormente a las células se les cambió el medio y se estimularon con diferentes concentraciones tanto de la mezcla de los CDPs (0.01 y 0.1 ug/mL) a diferentes tiempos.

Al finalizar el tiempo de tratamiento, se retira el medio de cultivo de la placa, se añaden 200 ul de buffer de lisis RIPA para un pocillo de placa de 6 pozos. Posteriormente se despegan las células con un scraper, haciendo un circulo y luego arrastrando las células a la parte de debajo de la placa, posteriormente se recuperan las células resuspendidas de la placa en tubos eppendorf. Finalmente se centrifugan las muestras a 4°C a 7500 rpm por 15 minutos.

7.13 Geles desnaturalizantes SDS-PAGE

A partir del extracto celular se cuantificaron las proteínas totales de los extractos, se tomaron 40 mg de proteínas a las cuales fueron desnaturalizadas con 35µl de buffer de carga SDS (Tris-HCl 0.06M, pH6.8, 5% de glicerol, 4% SDS, 4% β-mercaptoetanol y 0.0025% de azul de bromofenol) durante 15 minutos a 95 °C.

Las muestras fueron cargadas en un mini-gel de acrilamida desnaturalizante SDS-PAGE (gel separador: 12% de bis-acrilamida, buffer tris 1.5M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y 0.009% de Temed. Gel concentrador: 5% de bis- acrilamida, buffer tris 0.5 M pH6.8, persulfato de amonio 0.05% y 0.009% de Temed), se usó el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAM Tetra System y la electroforesis se corrió a 120V durante 2.5 horas.

7.14 Western blot

7.14.1 Transferencia de proteínas

Después de la electroforesis del gel SDS-PAGE se realizó la transferencia de proteínas usando el sistema Bio-Rad TRANS-BLOT SD SEMY-DRY TRANSFER CELL, se cortó la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel de acrilamida usando guantes de latex para evitar tocar la membrana con la piel, el sistema se coloca en el siguiente orden: 1. Base; 2. Papel filtro ultra-grueso biorad; 3. Membrana de nitrocelulosa; 4. Gel de acrilamida; 5. Papel filtro ultra-grueso biorad; 6. Tapa del cátodo con seguros y 7. Tapa de seguridad. Antes de armar el sistema los papeles filtros son humedecidos con buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%), el gel fue transferido a 15 voltios por 45 minutos (NOTA: si se usa membrana de nitrocelulosa no se debe dejar más de este tiempo puesto que se puede perder la muestra). Al finalizar la transferencia se tiñe el gel y la membrana de nitrocelulosa con azul brillante de comassie y rojo de ponceau respectivamente para corroborar que la transferencia haya sido eficiente.

7.14.2 Inmuno-detección

En un recipiente se colocó la membrana teñida y se puso a desteñir con 20 mililitros de TBS-T (Tris-HCL 10 mM; NaCl 0.9%; tween 0.1% pH 7.8) durante 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente, se desechó el TBS-T y se cambió por TBS-T con leche de bloqueo 5% y se puso a bloquear durante una hora en agitación constante a temperatura ambiente, después del bloqueo la membrana fue lavada con 15 mililitros de TBS-T tres veces en agitación constante durante 5 minutos cada lavado. Se diluyó los anticuerpos primarios a utilizar (anti-p-Akt, anti-Akt, anti p-S6k, y p-S6k) por separado en TBS-T con leche en proporción 1:10,000 y se agregó a la membrana incubándose 12-14 horas en agitación suave a 4°C. Transcurrido este tiempo se recupera el anticuerpo y se almacena a -20 °C, la membrana se lavó con TBS-T durante 7 minutos 3 veces a temperatura ambiente. Después se diluyó el anticuerpo secundario IgG anti-rabbit en TBS-T en proporción 1:5000 y se incubó con la membrana durante 3-4 horas en agitación suave a 4°C. Se

recuperó el anticuerpo y se guardó a -20°C , la membrana fue lavada con TBS-T por periodos de 7 minutos durante tres veces y una vez con TBS durante 5 minutos.

7.14.3 Revelado

En un recipiente se mezclaron las soluciones de luminol y peróxido de hidrógeno en proporción 1:1, se colocó la membrana sobre esta mezcla y se agitó manualmente durante 5 minutos, se retiró la membrana y se escurrió en una toalla sanitaria, la membrana fue colocada en un hipercassette amersham biosciences, y se colocó una película radiográfica sobre la membrana, se cerró el cassette y se dejó exponer durante 10 minutos, se retiró la película del cassette y se colocó en solución reveladora durante un minuto agitándose manualmente, después se cambió la película a la solución fijadora y se mantuvo durante un minuto con agitación manual, finalmente la película fue lavada con agua de la llave durante dos minutos.

8. 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.

9. RESULTADOS

9.1 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 se analizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En la **figura 10** se muestra el cromatograma representativo, en el cual se observa el empalme de los picos cromatográficos de la mezcla cruda de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 con el trazo en color azul, comparándose con la mezcla de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) sintéticos análogos a los producidos por *P.aeruginosa* PAO1, de los cuales se tienen los tiempos de retención en color verde. Asimismo, se puede apreciar que los picos D y E corresponden con el tiempo de retención del ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) y ciclo (*L-Pro-L-Val*) respectivamente y que el pico I corresponde con el tiempo de retención del ciclo (*L-Pro-L-Phe*) (**Figura 10**).

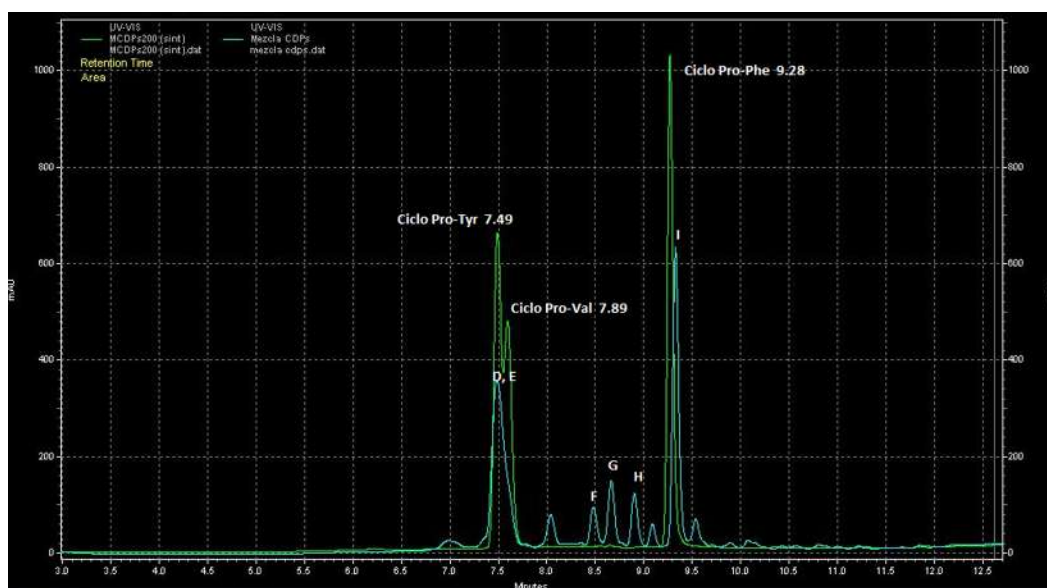


Figura 10. Analisis por cromatografía líquida de la mezcla cruda de CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1. Cromatograma representativo del extracto que contiene la mezcla cruda de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1, se indican los tiempos de retención de los ciclodipeptidos encontrados. El análisis se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC), con un detector UV-VIS L2420 a 210nm y una columna Agilent Polaris C18-A empleando el método descrito en materiales y métodos. Con color azul se indican los picos cromatográficos de la mezcla cruda de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1, el color verde representa los picos cromatográficos de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *P.aeruginosa* PAO1.

9.2 Purificación de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1

Se purificaron los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) de la mezcla de CDPs producida por *P. aeruginosa* PAO1 mediante HPLC. Para confirmar la pureza de los CDPs, después de la purificación de las fracciones de la mezcla de los CDPs producidos por *P.*

aeruginosa PAO1 se compararon las fracciones obtenidas con los tiempos de retención de los estándares y se seleccionaron las fracciones de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 que correspondieron con los tiempos de retención de los CDPs estándares. En la **Figura 11**, se muestra el cromatograma representativo, en el cual se observa el empalme de los cromatogramas de la mezcla de los CDPs sintéticos (trazo en color verde), y en los trazos D,E, I se muestran las fracciones purificadas de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1, en donde tenemos que el trazo D en color verde, corresponde con el tiempo de retención de ciclo Pro-Tyr, el trazo E en color morado, corresponde con el tiempo de retención del ciclo Pro-Val y el trazo I en color gris, corresponde con el tiempo de retención de ciclo Pro-Phe. Por lo tanto, teniendo que el tiempo de retención de la mezcla de los CDPs sintéticos corresponde con el tiempo de retención de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 se puede sugerir que las fracciones purificadas de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 correspondientes a los trazos D,E,I son ciclo Pro-Tyr, ciclo Pro-Val y ciclo Pro-Phe (**Figura 11**).

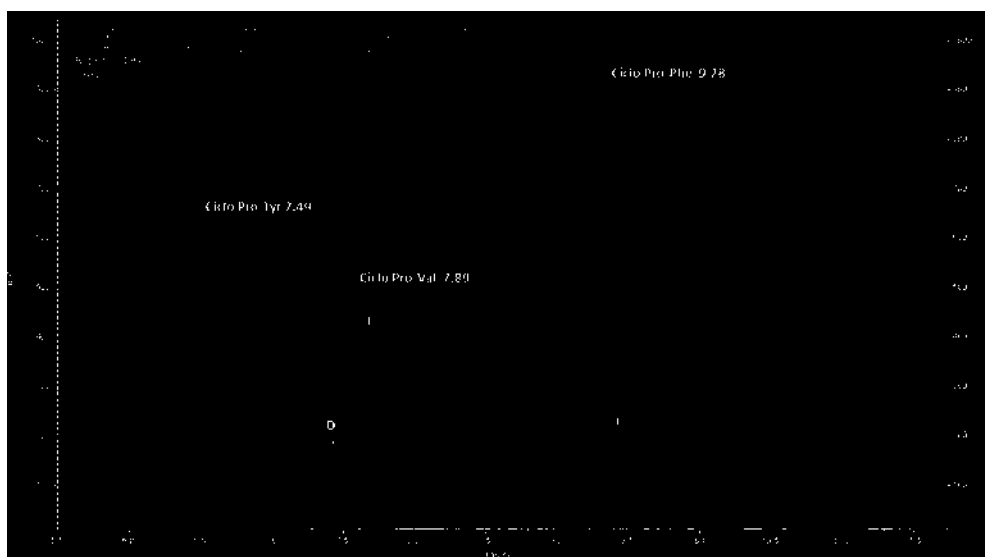


Figura 11. Analisis por cromatografía líquida de los CDPs purificados producidos por *P. aeruginosa* PAO1. Cromatograma representativo de los CDPs purificados de *P. aeruginosa* PAO1, se indican los tiempos de retención de los ciclodipéptidos encontrados. El análisis se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC), con un detector UV-VIS L2420 a 210nm y una columna Agilent Polaris C18-A empleando el método descrito en materiales y métodos. En color verde se indican los picos cromatográficos de la mezcla de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1. El pico cromatográfico D en color azul representa al ciclodipéptido ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), el pico cromatográfico E en color morado representa al ciclodipéptido ciclo (*L-Pro-L-Val*) y el pico cromatográfico D en color gris representa al ciclodipéptido ciclo (*L-Pro-L-Phe*) purificados producidos por *P. aeruginosa* PAO1.

Una vez obtenida y confirmada la purificación de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) producidos por *P. aeruginosa* PAO1, se procedió a realizar los ensayos de viabilidad así como de muerte celular inducida por los CDPs en las líneas celulares cancerosas humanas HeLa y CaCo-2.

9.3 Efecto citotóxico de los CDPs purificados producidos por *P. aeruginosa* en líneas celulares cancerosas humanas

Con la finalidad de evaluar el efecto citotóxico de los CDPs purificados de *P. aeruginosa* PAO1 en células cancerosas, se utilizaron las líneas celulares HeLa, Caco-2 como modelos de estudio, por lo cual se realizaron ensayos colorimétricos MTT para determinar la viabilidad celular, en donde, en la gráfica se muestra en el eje de las X las concentraciones de los CDPs (mg/mL) y en el eje de las Y el porcentaje de viabilidad celular. Se estimuló con diferentes concentraciones de cada uno de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) respectivamente en los cultivos celulares y los resultados obtenidos mostraron que los tres CDPs, así como la mezcla cruda causaron una disminución en la viabilidad celular de forma dosis dependiente después de 24 H de estimulación, dicho efecto se observó tanto en las células crecidas en medio completo (**Figura. 12-A y 12-B**), como en medio incompleto (**Figura. 13-A y 13-B**).

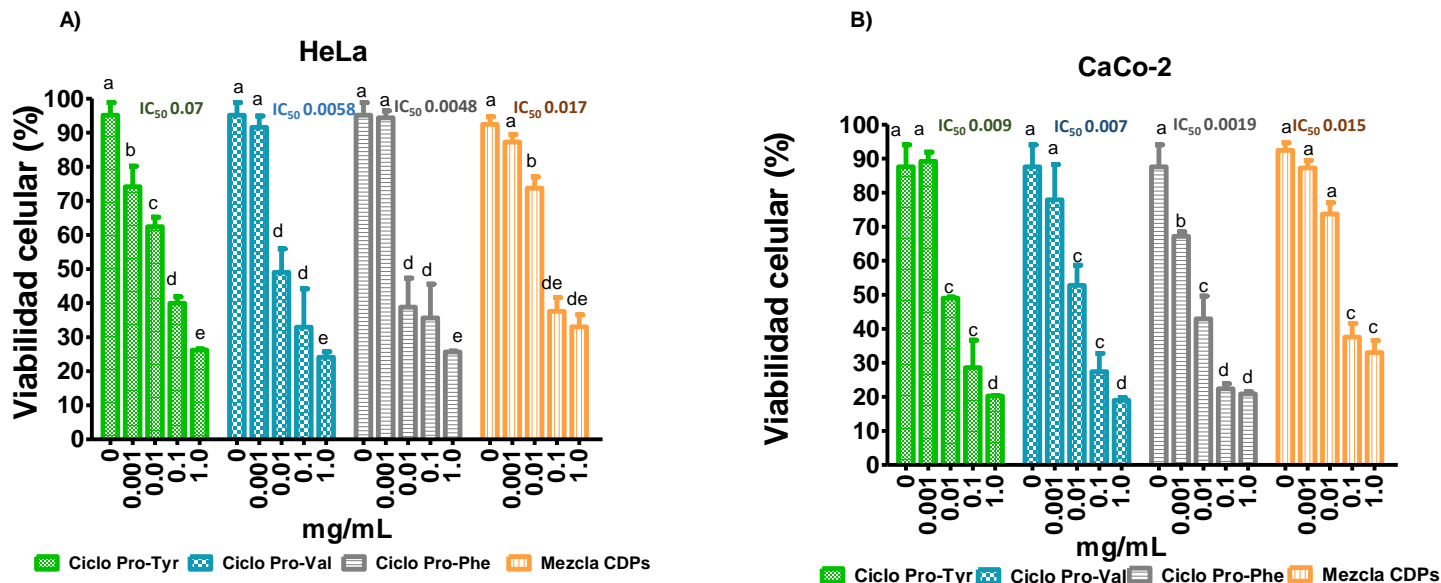


Figura 12. Efecto citotóxico de los CDPs purificados producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo crecidas en medio completo. Las células fueron crecidas en medio completo con la mezcla de los CDPs durante 24 H. (A) y (B) La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Las 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. Concentración inhibitoria 50 (IC50) HeLa: de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*), así como la mezcla cruda, fue de 0.07, 0.0058, 0.0048 y 0.017 mg/mL, respectivamente, CaCo-2: de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*), así como la mezcla cruda fue de 0.009, 0.007, 0.0019 y 0.015 mg/mL, respectivamente.

La viabilidad de las células fue afectada por cada uno de los CDPs purificados, así como por la mezcla cruda, particularmente a concentraciones de 0.1 y 1 mg/mL de los CDPs, ya que se mostró una disminución en la viabilidad celular hasta de un 65% y 75%, respectivamente (**Figura. 12 y 13**). La concentración inhibitoria 50 (IC50) de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y la mezcla cruda fue de 0.07, 0.0058, 0.0048 y 0.017 mg/mL, respectivamente para las células HeLa (**Figura 12-A**). La concentración inhibitoria 50 (IC50) de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y la mezcla cruda fue de 0.009, 0.007, 0.0019 y 0.015 mg/mL, respectivamente para las células CaCo-2 (**Figura 12-B**).

Las células tratadas con los CDPs en medio incompleto (**Figura 13-A y 13-B**) mostraron ligeras diferencias con respecto a las células en medio completo, sin embargo dichas diferencias no fueron significativas.

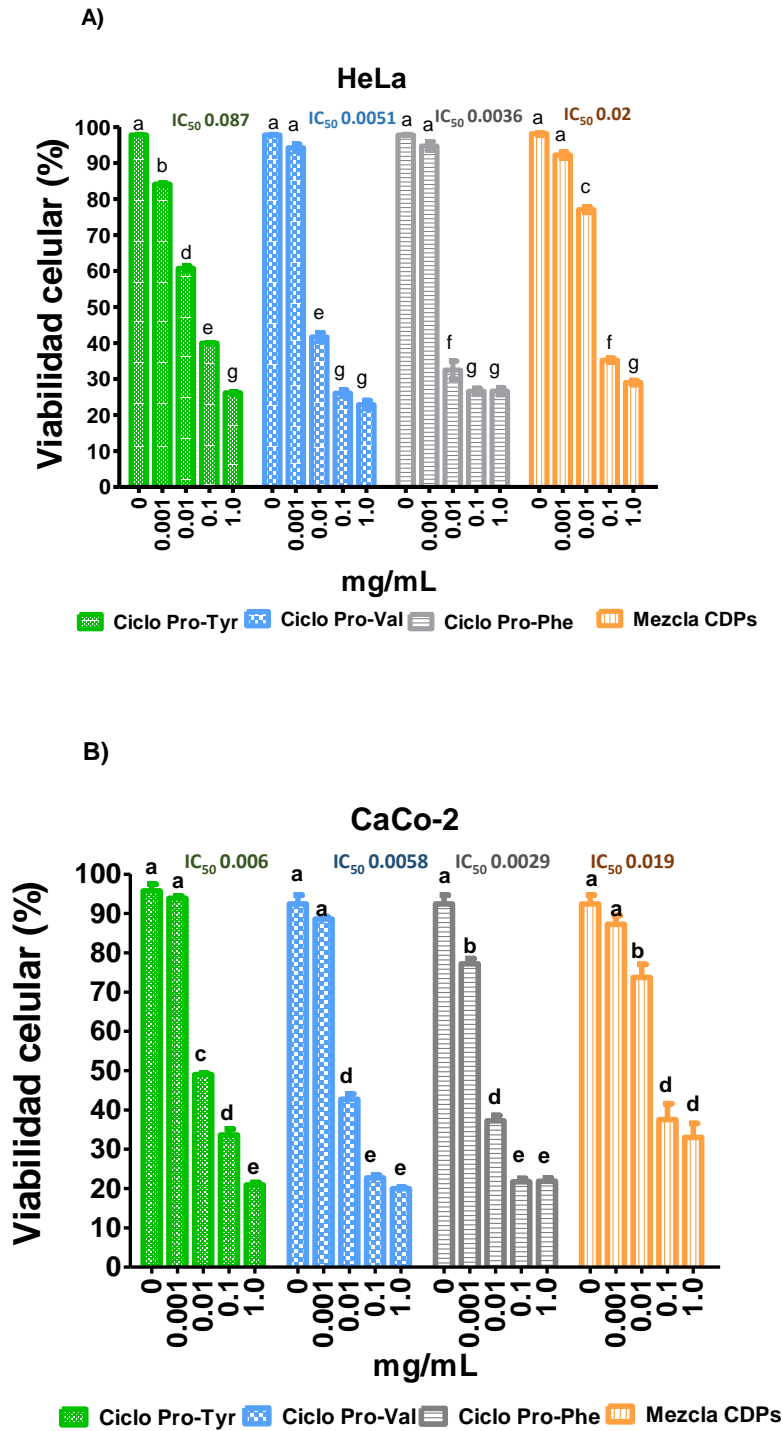


Figura 13. Efecto de los CDPs purificados producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio incompleto. Las células fueron incubadas en medio incompleto con la mezcla de los CDPs durante 24 h. (A) y (B) La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se muestran en letras.

9.4 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 purificados. Para discriminar las células que se encontraban en necrosis y/o apoptosis se realizaron ensayos de citometría de flujo con Anexina V/IP. Los resultados obtenidos en las pruebas de citometría, se observan en la **Figura 14** donde se muestran las gráficas de puntos representativas de los diferentes tratamientos con los CDPs durante 24 H, para las células HeLa. 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 la mezcla de los CDPs (**Figura 14 C**) así como con los CDPs purificados (**Figura 14 D,E y F**) inducen apoptosis de manera dosis dependiente hasta un 90% y 70% para las células HeLa, tomando como 100% la inducción producida por la actinomicina D a 50 mM (**Figura 14 B**); y como control negativo se utilizó el vehículo (DMSO/H₂O) (**Figura 14 A**).

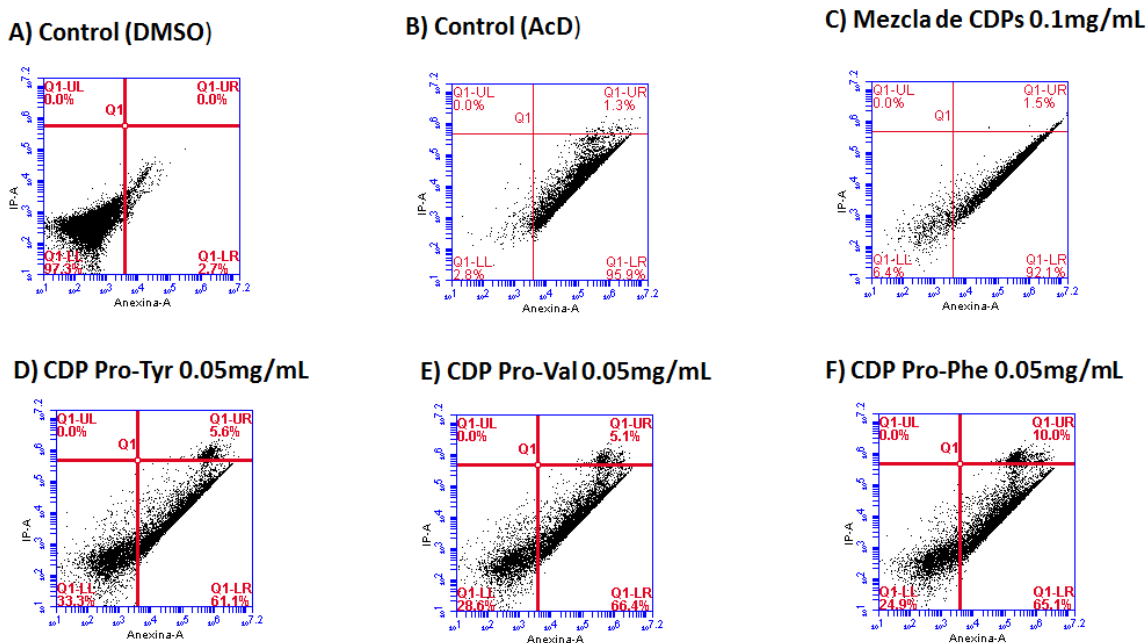


Figura 14. Inducción de apoptosis por la mezcla de los CDPs purificados producidos por *P. aeruginosa* en células HeLa. Gráficas de puntos representativa de las células HeLa tratadas con la mezcla cruda de los CDPs, así como los CDPs purificados durante 24 H. (A) DMSO 0.1% (control negativo); (B) Actinomicina D (5mM; control positivo); (C)

tratamiento con 0.1 mg/mL de la mezcla de los CDPs en células HeLa; (D,E y F) tratamiento con 0.05 mg/mL de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) respectivamente en células HeLa. Los histogramas de cada tratamiento representan el análisis de 10,000 eventos por citometría de flujo.

El tratamiento con cada uno de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), así como la mezcla cruda produce apoptosis en las células HeLa y CaCo-2, este efecto se puede observar desde la concentración de 0.0001 mg/mL e incrementa de manera dependiente de la concentración hasta alcanzar una tasa de apoptosis superior al 80% (**Figura. 15-A y 15-B**), dicho efecto se observó tanto en las células crecidas en medio completo (**Figura. 15-A y 15-B**), como en medio incompleto (**Figura. 16-A y 16-B**).

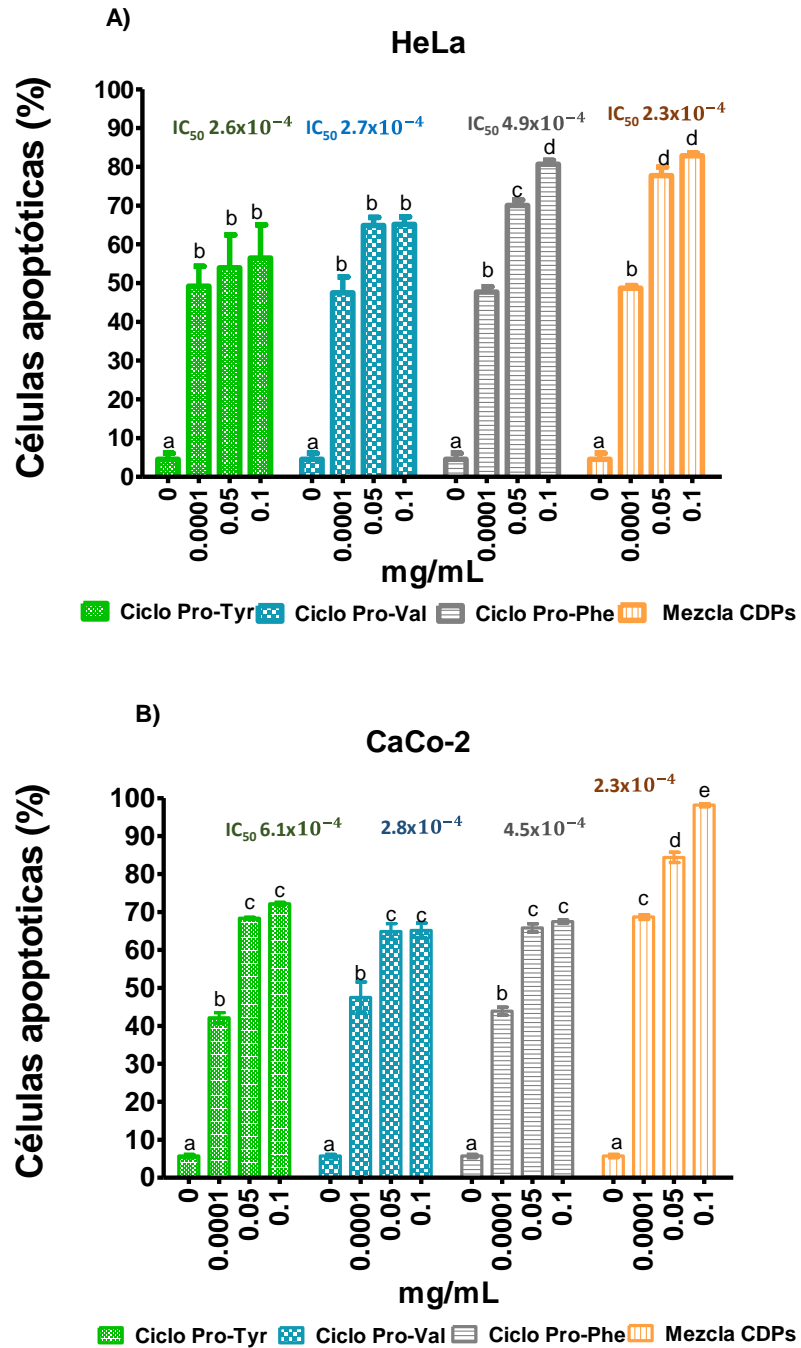
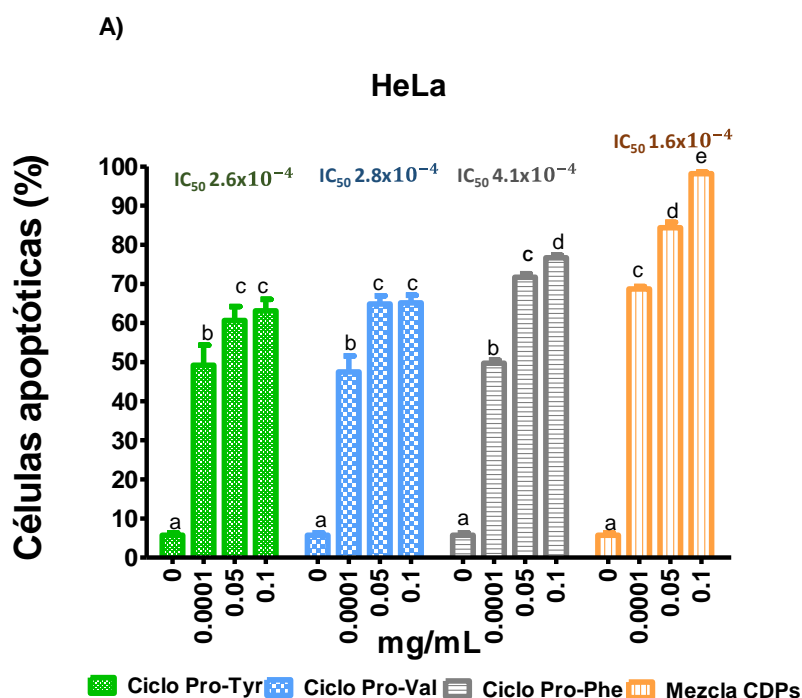


Figura 15. Porcentaje de apoptosis inducida por los CDPs purificados producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio completo. (A) Porcentaje de células apoptóticas de la línea celular HeLa. (B) Porcentaje de células apoptóticas de la línea celular CaCo-2. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO) ($p < 0.05$) se muestran en letras.

Además se determinaron los valores de IC₅₀ de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y de la mezcla cruda para las células apoptóticas, los cuales fueron de 2.6×10^{-4} , 2.7×10^{-4} , 4.9×10^{-4} y 2.3×10^{-4} mg/mL respectivamente, para la línea celular HeLa, como se muestra en la **Figura 15-A**. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y la mezcla cruda para las células apoptóticas de la línea celular CaCo-2 fue de 6.1×10^{-4} , 2.8×10^{-4} , 4.5×10^{-4} y 2.3×10^{-4} mg/mL, respectivamente (**Figura 15-B**). Estos resultados indican que la mezcla de los ciclodipéptidos resultó más eficaz que los CDPs purificados que componen la mezcla, induciendo a apoptosis en ambas líneas celulares cancerosas. Además, éstos 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.

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.



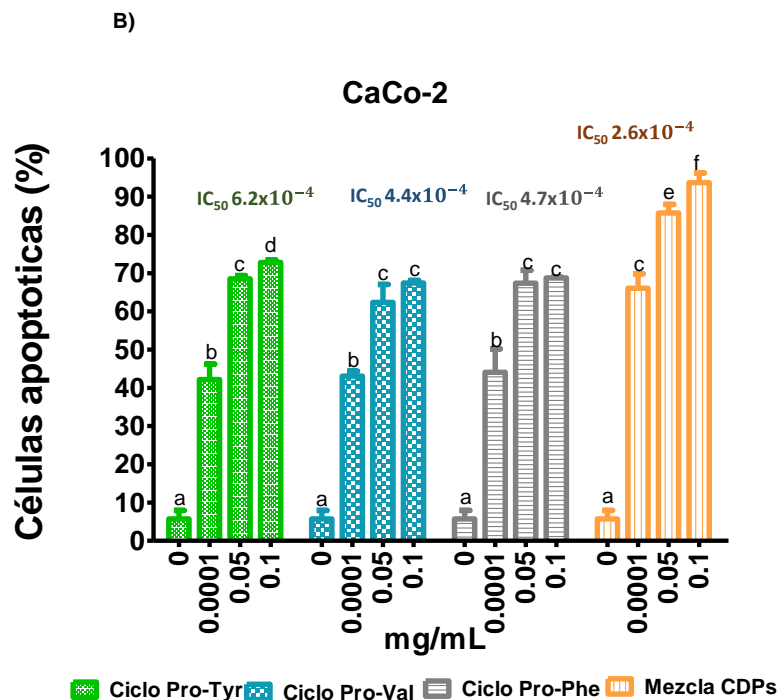


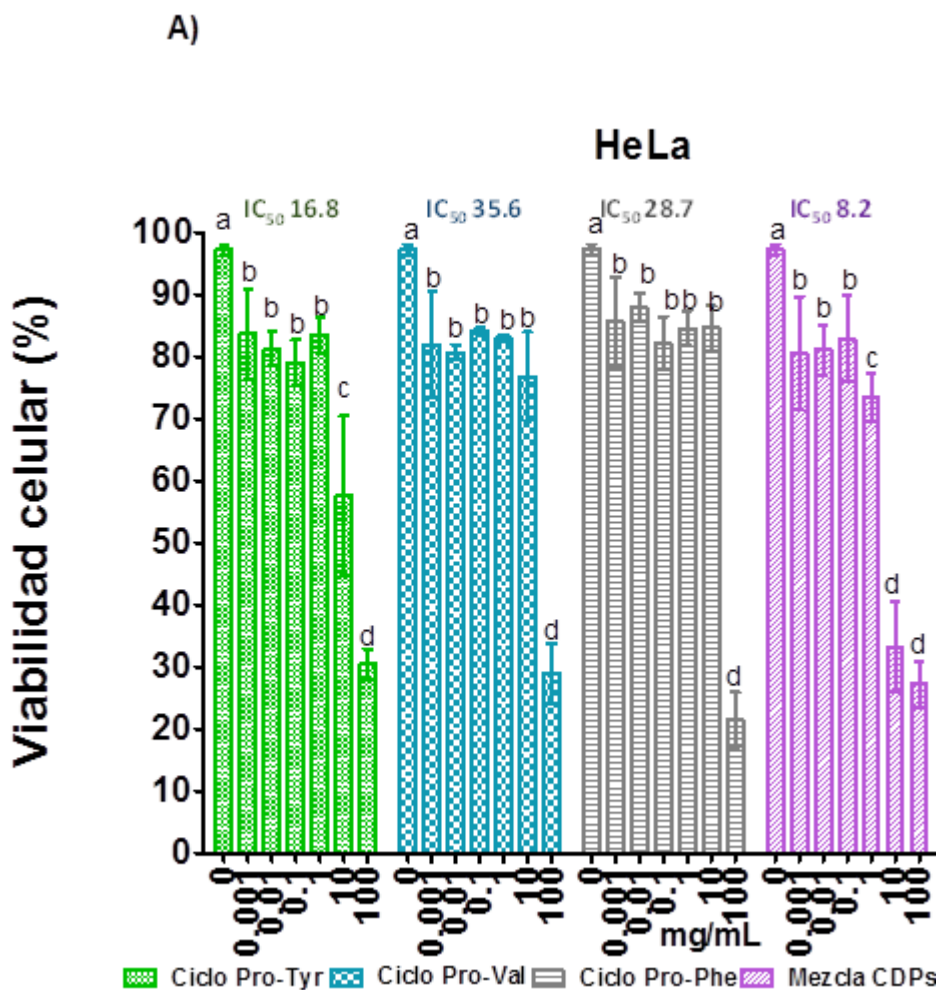
Figura 16. Porcentaje de apoptosis inducida por los CDPs purificados producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio incompleto. (A) Porcentaje de células apoptóticas de la línea celular HeLa. (B) Porcentaje de células apoptóticas de la línea celular CaCo-2. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO) ($p < 0.05$) se muestran en letras.

9.5 Efecto de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en líneas celulares cancerosas humanas

Con la finalidad de evaluar el efecto citotóxico de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células cancerosas, se utilizaron las líneas celulares HeLa y CaCo-2 como modelos de estudio. Por lo cual se realizaron ensayos colorimétricos MTT para determinar la viabilidad celular, en donde, en la gráfica se muestra en el eje de las X las concentraciones de los CDPs (mg/mL) y en el eje de las Y el porcentaje de viabilidad celular. Se estimuló con diferentes concentraciones de cada uno de los CDPs ciclo (*L-Pro-L-Val*), ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y ciclo (*L-Pro-L-Tyr*) sintéticos respectivamente en los cultivos celulares y los resultados obtenidos mostraron que los tres CDPs, así como la mezcla de los CDPs causaron una disminución en la viabilidad celular de forma dosis dependiente a las concentraciones de 1, 10 y 100 mg/mL después

de 24 H de estimulación, dicho efecto se observó tanto en las células crecidas en medio completo (Figura. 17-A y 17-B), como en medio incompleto (Figura. 18-A y 18-B).

La viabilidad de las células fue afectada por cada uno de los CDPs sintéticos como por la mezcla, particularmente con 10 y 100 mg/mL de los CDPs por separado, ya que se mostró una disminución en la viabilidad celular hasta de un 35% y 75%, respectivamente y en el caso de la mezcla de los CDPs sintéticos, se mostró una disminución en la viabilidad celular hasta de un 70% y 75%, respectivamente (Figura. 17-A y 17-B).



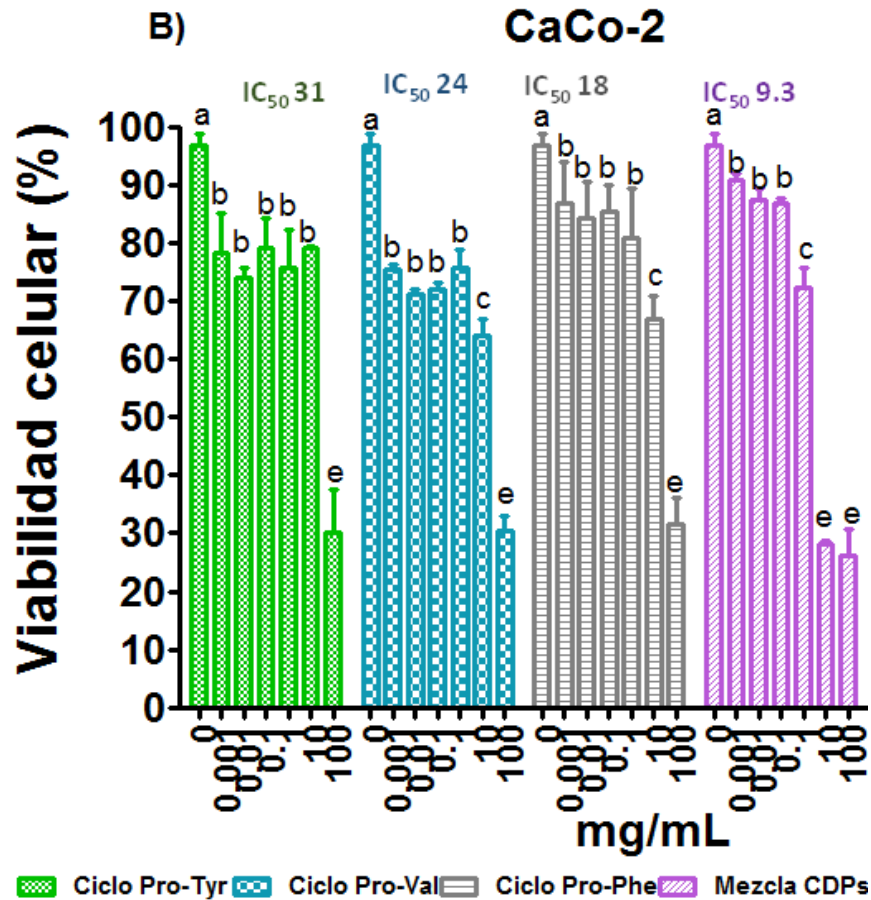
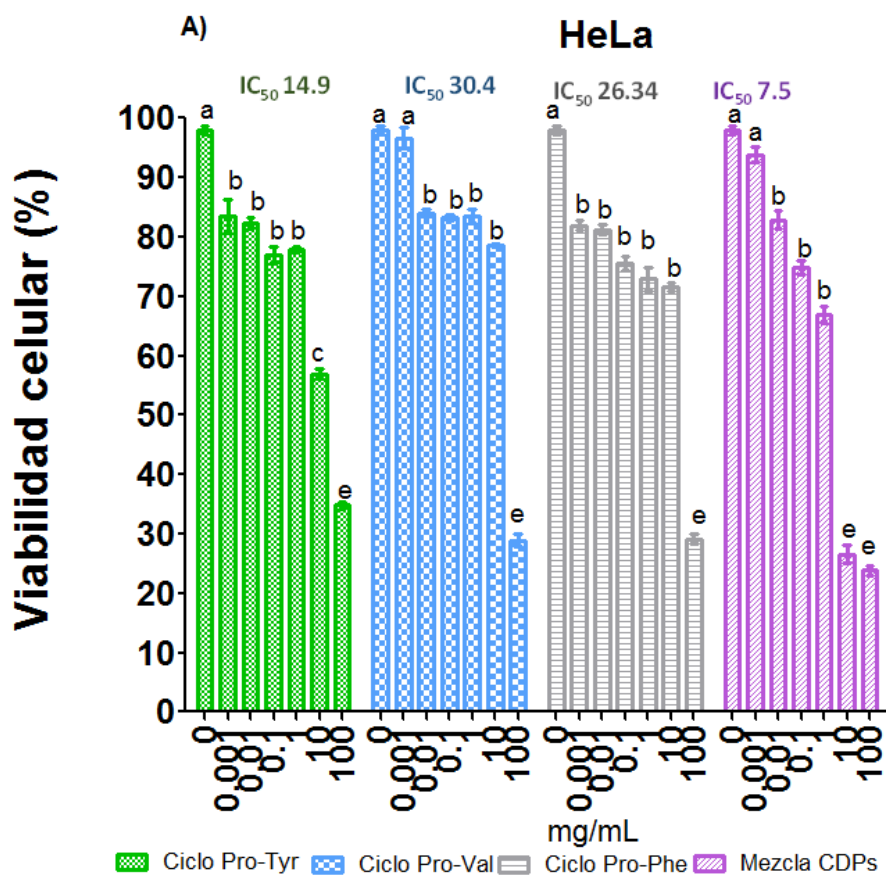


Figura 17. Efecto citotóxico de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo crecidas en medio completo. Las células fueron crecidas en medio completo con la mezcla de los CDPs durante 24 H. (A) y (B) La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico 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. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) en la línea celular HeLa de los CDPs sintéticos ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*), así como la mezcla cruda, fue de 16.8, 35.6, 28.7 y 8.2 mg/mL, respectivamente. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) en la línea celular CaCo-2 de los CDPs purificados ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*), así como la mezcla cruda fue de 31, 24, 18 y 9.3 mg/mL, respectivamente.

La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los CDPs sintéticos ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y la mezcla cruda fue de 16.8, 35.6, 28.7 y 8.2 mg/mL, respectivamente para las células HeLa (**Figura 17-A**). La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los CDPs

sintéticos ciclo (*L-Pro-L-Tyr*), ciclo (*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*) y la mezcla cruda fue de 31, 24, 18 y 9.3 mg/mL, respectivamente para las células CaCo-2 (**Figura 17-B**).

Las células tratadas con los CDPs sintéticos en medio incompleto (**Figura 18-A y 18-B**) mostraron ligeras diferencias con respecto a las células en medio completo, sin embargo dichas diferencias no fueron significativas.



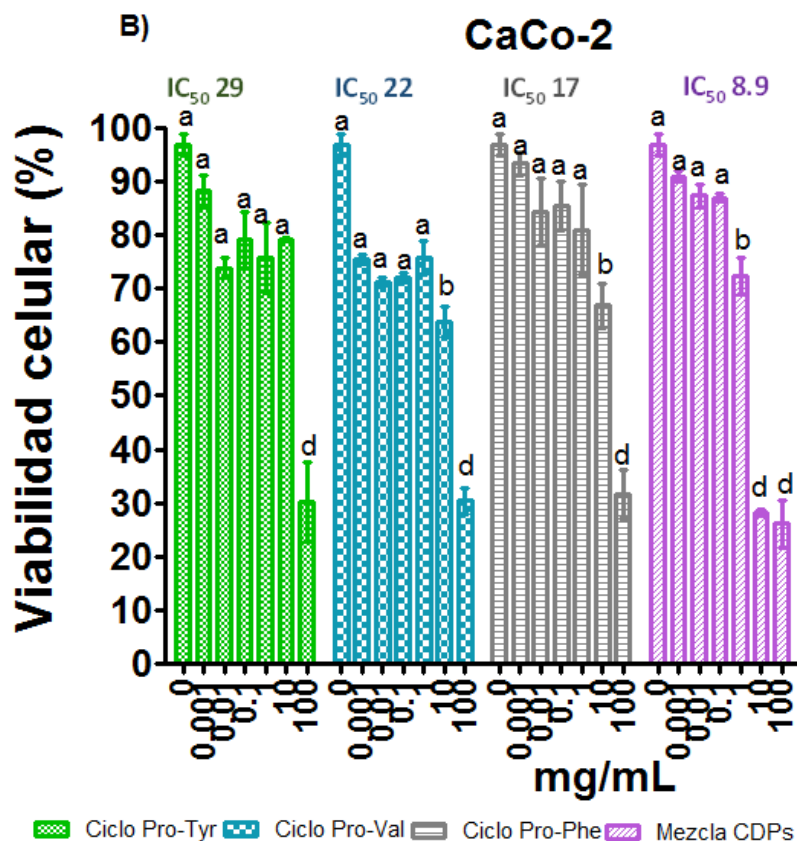


Figura 18. Efecto de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio incompleto. Las células fueron incubadas en medio incompleto con la mezcla de los CDPs durante 24 h. (A) y (B) La viabilidad fue determinada con el ensayo colorimétrico MTT. Se presenta la media de 3 experimentos independientes por triplicado, las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se muestran en letras.

9.6 Evaluación de la apoptosis inducida por la mezcla de los CDPs sintéticos análogos a los producidos por *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 sintéticos análogos a los producidos por *P. aeruginosa*. Para discriminar las células que se encontraban en necrosis y/o apoptosis se realizaron ensayos de citometría de flujo con Anexina V/IP. El tratamiento con la mezcla de los CDPs sintéticos produce apoptosis en las células HeLa y CaCo-2, este efecto se puede observar desde la concentración de 1 mg/mL e incrementa de manera dependiente de la concentración hasta alcanzar una tasa de apoptosis superior al 40% (**Figura. 19-A y 19-B**).

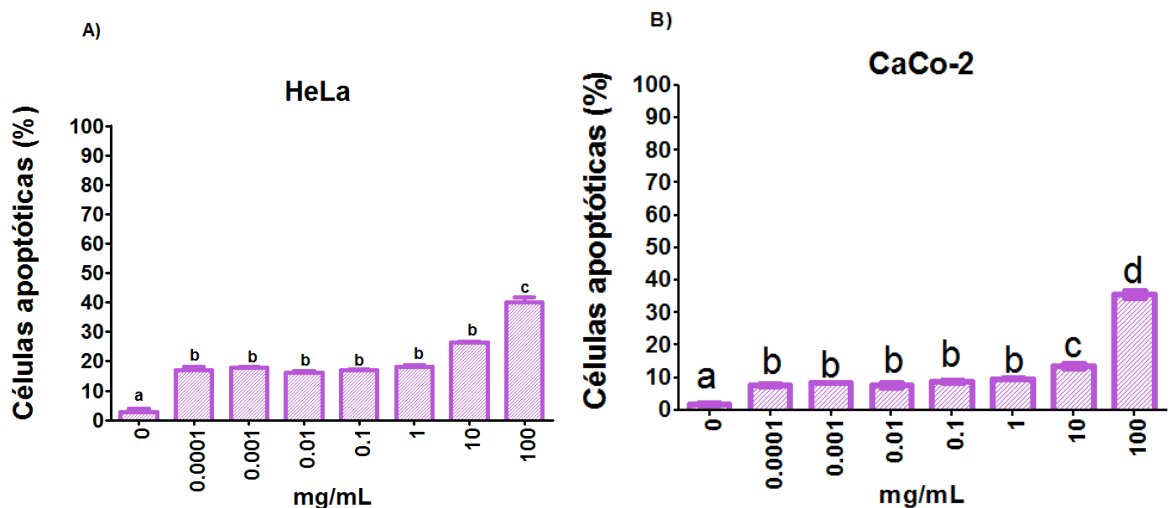


Figura 19. Porcentaje de apoptosis inducida por la mezcla de los CDPs sintéticos análogos a los p producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en células HeLa y CaCo-2 crecidas en medio completo. (A) Porcentaje de células apoptóticas de la línea celular HeLa. (B) Porcentaje de células apoptóticas de la línea celular CaCo-2. 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.

10. DISCUSIÓN

Los ciclodipéptidos (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 y Caco-2). 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.

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 12**). Nuestros resultados indican que la combinación CDPs de *P. aeruginosa* es más potente para inducir muerte celular programada vía apoptosis.

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, se demostró que la mezcla de los CDPs de *P. aeruginosa* activan la vía intrínseca de la apoptosis donde participa activamente la mitocondria (Vázquez-Rivera, et al. 2015). Y no se encontró participación de la vía extrínseca lo que sugiere que los CDPs no están interaccionando con receptores de muerte celular y 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.

11. CONCLUSIÓN

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 en células cancerosas Hela y Caco-2 a través de la modulación por fosforilación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR.

12. BIBLIOGRAFÍA

Li, Y.H.; Tian, X. **Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms.** *Sensors* **2012**, *12*, 2519–2538.

Coutinho, H.D.; Falcao-Silva, V.S.; Goncalves, G.F. **Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: A tool for the health workers.** *Int. Arch. Med.* **2008**, *1*, 24.

Silby, M.W.; Winstanley, C.; Godfrey, S.A.; Levy, S.B.; Jackson, R.W. ***Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable.** *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 652–680.

Rau, M.H.; Hansen, S.K.; Johansen, H.K.; Thomsen, L.E.; Workman, C.T.; Nielsen, K.F.; Jelsbak, L.; Hoiby, N.; Yang, L.; Molin, S. **Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts.** *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 1643–1658.

Li, Y.H.; Tian, X. **Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms.** *Sensors* **2012**, *12*, 2519–2538.

Kendra P. Rumbaugh. **Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface.** *Anal Bioanal Chem* (2007) 387: 425–435

Synthesis and anti-cancer activity of naturally occurring 2,5-diketopiperazines Adriano Mollica [a,*](#), Roberto Costante [a](#), Serena Fiorito [a](#), Salvatore Genovese [a](#), Azzurra Stefanucci [b](#), Veronique Mathieu [c](#), Robert Kiss [c](#), Francesco Epifano [a](#) Cornacchia C, Cacciatore I, Baldassarre L, Mollica A, Feliciani F, Pinnen F. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:2–12 Kretzschmar G, Zierau O, Wober J, Tischer S, Metz P, Vollmer G. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;118:1–9.

Prasad, C. **Bioactive cyclic dipeptides.** *Peptides*, **1995**, *16*, 151- 164. Fischer, P.M. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. *J. Pept. Sci.*, **2003**, *9*, 9-35.

Budesinsky, M.; Cisarova, I.; Podlah, J.; Borremans, F.; Martins, J.C.; Waroquier M.; Pauwels, E. **Structures of cyclic dipeptides: an X-ray and computational study of cis- and trans-cyclo(Pip-Phe), cyclo(Pro-Phe) and their N-methyl derivatives.** *Acta Cryst.*, **2010**, *B66*, 662-677.

Ressurreição, A.S.M.; Delatouche, R.; Gennari, C.; Piarulli, U. **Bifunctional 2,5-diketopiperazines as rigid three-dimensional scaffolds in receptors and peptidomimetics.** *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 217-228.]

Horton, D.A.; Bourne, G.T.; Smythe, M.L. **Exploring privileged structures: The combinatorial synthesis of cyclic peptides.** *Mol. Divers.*, **2000**, *5*, 289-304.

McClelland, K.; Milne, P.J.; Lucieto, F.R.; Frost, C.; Brauns, S.C.; Van De Venter, M.; Du Plessis J.; Dyason, K. **An investigation into the biological activity of the selected histidine-containing diketopiperazines cyclo(His-Phe) and cyclo(His-Tyr).** *J. Pharm. Pharmacol.*, **2004**, *56*, 1143-1153.

Joyce, Johanna A., et al. "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis." *Cancer cell* 5.5 (2004): 443-453.

Shied, Bertrum, Parithychery R. Srinivasan, and Ernest Borek. "Deoxyribonucleic acid methylase of mammalian tissues." *Biochemistry* 7.1 (1968): 280-285.

Tung, Nadine, et al. "Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations." *Nature Reviews Clinical Oncology* (2016).

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. "Hallmarks of cancer: the next generation." *cell* 144.5 (2011): 646-674.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). **Genetic instabilities in human cancers.** *Nature*, 396(6712), 643-649.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*,100(1), 57-70.

Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48-58.

Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). **Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante.** *Salud pública de México*, 51, s335-s344.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). **Cancer genes and the pathways they control.** *Nature medicine*, 10(8), 789-799.

Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. (2001). **Human DNA repair genes.** *Science*, 291(5507), 1284-1289.

Arlt, F., & Stein, U. (2009). **Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(12), 2356-2359.

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., ... & Meijer, C. J. (2003). **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-527.

Baba, A. I., & Cătoi, C. (2007). **Comparative oncology.**

Spitz, D. R., Sim, J. E., Ridnour, L. A., Galoforo, S. S., & Lee, Y. J. (2000). **Glucose Deprivation-Induced Oxidative Stress in Human Tumor Cells: A Fundamental Defect in Metabolism?**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 349-362.

Boveri, T. (2008). **Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris.** *Journal of cell science*, 121(Supplement 1), 1-84.

Suresh, S. (2007). **Biomechanics and biophysics of cancer cells.** *Acta Materialia*, 55(12), 3989-4014.

Llaguno, A. T., Parra, V. N., Fuenzalida, G. S., & Ramos, S. A. (2016). **Incidence of Cervical Dysplasia and Cervical Cancer in Patients Younger Than 25 Years in a Dysplasia Clinic.** *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 29(2), 179.

Anaya-Ruiz, M., Vincent, A. K., & Perez-Santos, M. (2014). **Cervical cancer trends in Mexico: incidence, mortality and research output.** *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(20), 8689-8692.

Stanley, M. (2006). **Immune responses to human papillomavirus.** *Vaccine*, 24, S16-S22.

Chelimo, C., Wouldes, T. A., Cameron, L. D., & Elwood, J. M. (2013). **Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer.** *Journal of Infection*, 66(3), 207-217.

Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., de Sanjosé, S., Franceschi, S., & Clifford, G. M. (2012). **Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer.** *International journal of cancer*, 131(10), 2349-2359.

M Nauli, A., & M Nauli, S. (2013). **Intestinal transport as a potential determinant of drug bioavailability.** *Current clinical pharmacology*, 8(3), 247-255.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *British journal of cancer*, 26(4), 239.

Hengartner, M. O., & Horvitz, H. R. (1994). **C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2.** *Cell*,76(4), 665-676.

Evan, G., & Littlewood, T. (1998). **A matter of life and cell death.** *Science*,281(5381), 1317-1322.

Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., & Kobayashi, Y. (2003). **Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages.** *The Journal of Immunology*, 171(9), 4672-4679.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.

Ichim, G., & Tait, S. W. (2016). **A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process.** *Nature Reviews Cancer*.

Fisher, D. E. (1994). **Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold.** *Cell*,78(4), 539-542.

Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). **Apoptosis signaling.** *Annual review of biochemistry*, 69(1), 217-245.

Elmore, S. (2007). **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Cohen, N. (1997, May). **Fractal antenna applications in wireless telecommunications**. In *Electronics Industries Forum of New England, 1997. Professional Program Proceedings* (pp. 43-49). IEEE.

Elmore, S. (2007). **Apoptosis: a review of programmed cell death**. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Cookson, B. T., & Brennan, M. A. (2001). **Pro-inflammatory programmed cell death**. *Trends in microbiology*, 9(3), 113-114.

Liu, X. H., Kwon, D., Schielke, G. P., Yang, G. Y., Silverstein, F. S., & Barks, J. D. (1999). **Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage**. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(10), 1099-1108.

Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). **Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells**. *Infection and immunity*, 73(4), 1907-1916.

Christofferson, D. E., & Yuan, J. (2010). **Necroptosis as an alternative form of programmed cell death**. *Current opinion in cell biology*, 22(2), 263-268.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., ... & Tschopp, J. (2000). **Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule**. *Nature immunology*, 1(6), 489-495.

Chen, Y., Henson, E. S., Xiao, W., Huang, D., McMillan-Ward, E. M., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2016). **Tyrosine kinase receptor EGFR regulates the switch in cancer cells between cell survival and cell death induced by autophagy in hypoxia**. *Autophagy*, 1-18.

Yao, Z., Delorme-Axford, E., Backues, S. K., & Klionsky, D. J. (2015). **Atg41/Icy2 regulates autophagosome formation.** *Autophagy*, *11*(12), 2288-2299.

Maltez, V., Tubbs, A., Aachoui, Y., Cook, K., Whitmire, J., & Miao, E. (2015). **Inflammasomes recruit natural killer cells to prevent infection by a ubiquitous environmental bacterium (MPF4P. 726).** *The Journal of Immunology*, *194*(1 Supplement), 136-2.

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). **mTOR signaling in growth control and disease.** *Cell*, *149*(2), 274-293.

Milne PJ, Hunt AL, Rostoll K, Van der Walt JJ, Graz CJM. **The biological activity of selected cyclic dipeptides.** *J Pharm Pharmacol* 1998;50:1331–7).

Graz et al., **Cyclic dipeptides in the induction of maturation for cancer therapy.** *J Pharm Pharmacol* 2000;52:75–8

S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. **Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates.** *Bioorg Med*