



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología

MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL CONTRA LA LÍNEA CELULAR DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA K562

Tesis

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Biológicas

Opción: Biotecnología Molecular Agropecuaria

PRESENTA

M.C. Luis José Flores Álvarez

Asesor: **Dr. Joel Edmundo López Meza**

Co-asesora: **Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa**

Sinodales:

Dra. Mayra Toledo Cuevas

Dr. Daniel Godínez Hernández

Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos

Morelia, Michoacán, septiembre de 2018

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.M.S.N.H, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-asesoría del Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la U.M.S.N.H (proyecto 14.5) y del CONACyT (proyecto CB-2013-221363), y la beca CONACyT número 219547.

AGRADECIMIENTOS

*“Tu futuro todavía no ha sido escrito, ¡ni el de ninguno de ustedes!. Tu futuro es el que tú te formes. Así que háganse uno muy bueno”.
Emmet Brown. Back to the Future III (1990).*

A mi familia, Marina y Luisito, mi fuerza e inspiración para poder realizar y terminar este proceso.

A mis padres, por sus palabras y apoyo.

Al Dr. Joel Edmundo López Meza por recibirme y permitirme realizar este proyecto en su laboratorio. Gracias.

Agradezco a la Dra. Alejandra Ochoa, Dra. Mayra Toledo, Dr. Daniel Godínez y Dr. Sergio Gutiérrez por sus aportaciones al proyecto.

A mis compañeros/amigos de laboratorio Israel, Jacky, Marisol, Mary Tere, Mony Sánchez y Mitchell que me enseñaron y apoyaron con una mano amiga en las situaciones difíciles.

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada (219547) para la realización de mis estudios de Doctorado.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
3.1. Cáncer: características y epidemiología.....	3
3.2. Leucemia: características y epidemiología	3
3.3. Leucemia linfoide (LL)	5
3.4. Leucemia mieloide (LM).....	5
3.5. Leucemia mieloide crónica (LMC)	6
3.6. Tratamientos contra el cáncer y leucemia.....	8
3.7. Nuevos tratamientos contra el cáncer	9
3.8. Mecanismos de muerte celular (necrosis, apoptosis y otros mecanismos)	10
3.9. Péptidos antimicrobianos (PA's).....	17
3.10. Mecanismos de acción de los PA's	18
3.11. Citotoxicidad de los PA's	19
3.12. Péptidos antimicrobianos de plantas (PAP's).....	21
4. ANTECEDENTES.....	29
5. JUSTIFICACIÓN.....	31
6. HIPÓTESIS	33
7. OBJETIVOS.....	33
7.1. General	33
7.2. Específicos	33
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
9. RESULTADOS.....	35
9.1. CAPÍTULO I.	36
9.2. CAPÍTULO II.....	46
9.3. CAPÍTULO III.....	68
10. DISCUSIÓN GENERAL.....	76
11. CONCLUSIÓN GENERAL.....	80
12. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Hematopoyesis..	4
Figura 2. Formación del cromosoma Filadelfia..	7
Figura 3. Apoptosis.	13
Figura 4. Apoptosis independiente de caspasas.....	14
Figura 5. Autofagia y necroptosis.....	16
Figura 6. Clasificación de los PA's..	18
Figura 7. Mecanismos de acción de los PA's.	20
Figura 8. Blancos intracelulares de los PA's.	21
Figura 9. Estructura de los PAP's con actividad citotóxica..	23

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. PA's con actividad citotóxica contra células cancerosas.....	22
Tabla 2. Tioninas con actividad citotóxica	27
Tabla 3. Defensinas de plantas con actividad citotóxica.....	27
Tabla 4. Ciclotidos con actividad citotóxica	28

1. RESUMEN

El cáncer a nivel mundial causó 8.8 millones de muertes en el 2015, siendo la leucemia uno de los diez tipos de cáncer más importantes por el alto número de muertes que genera. Los tratamientos convencionales contra el cáncer son la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, estos tienen varios inconvenientes como su baja especificidad, el desarrollo de mecanismos de tolerancia y los efectos secundarios en el paciente. Estas limitaciones han llevado a la búsqueda de nuevas terapias alternativas como las vacunas, nanotecnología y productos naturales como los péptidos antimicrobianos (PA's). Los PA's representan una nueva familia de agentes anticancerosos que disminuyen las limitaciones de los tratamientos convencionales. Hasta el momento se han descrito más de 3000 PA's, de los cuales 217 poseen actividad anticancerosa. De las 12 familias de PA's de plantas, 3 de ellas tienen actividad citotóxica y anticancerosa: las defensinas, tioninas y ciclótidos. Sin embargo, los mecanismos de citotoxicidad no se conocen a detalle. En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de las defensinas de plantas PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) y γ -tionina (*Capsicum chinense*) contra la línea celular de leucemia mieloide crónica humana K562 y se analizó su mecanismo de acción. Los PA's PaDef y γ -tionina inhibieron la viabilidad de las células K562 de una manera dependiente de la concentración, con una IC_{50} = 97.3 μ g/ml y 290 μ g/ml, respectivamente. Ambos péptidos antimicrobianos no mostraron actividad citotóxica sobre las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) de un paciente sano. Para definir el mecanismo de muerte celular de las defensinas PaDef y γ -tionina primero se evaluó el daño a la membrana celular, la cual no se afectó por ninguna de las defensinas. Por otra parte, se analizó la inducción de apoptosis en las células sometidas al tratamiento con los PA's. Las células tratadas con PaDef mostraron un 37.8% de células en apoptosis, mientras que en aquellas tratadas con γ -tionina fue de 30%, a las 12 h. Además, PaDef indujo la apoptosis extrínseca en las células K562 ya que aumentó los niveles de expresión del ARNm de la caspasa 8 (~2 veces) y la actividad de esta (92%). Adicionalmente, PaDef estimuló la expresión del ARNm de TNF- α (~4 veces) y de su receptor TNFR1 (~10 veces), así como la secreción de TNF- α al medio a las 24 h (17 pg/ml). Por otro lado, la defensina γ -tionina indujo apoptosis en las células K562 a través de una ruta independiente de caspasas. γ -tionina provocó la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), incrementó el contenido de calcio intracelular y activó las calpaínas a tiempos cortos de tratamiento (2 h). En conclusión, las defensinas PaDef y γ -tionina son citotóxicos para la línea celular de leucemia K562, induciendo la apoptosis por vías diferentes, lo cual es una propiedad novedosa para estas defensinas de plantas.

Palabras claves. Péptidos antimicrobianos; leucemia; K562; apoptosis; PaDef; γ -tionina.

2. ABSTRACT

Cancer worldwide caused 8.8 million deaths in 2015, being leukemia one of the ten most important cancer due to the high number of deaths. The conventional treatments against cancer are surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, these have several drawbacks such as low specificity, development of tolerance mechanisms and side effects in patients. These limitations have led to the search for new alternative therapies such as vaccines, nanotechnology and natural products such as antimicrobial peptides (AMP's). AMP's represent a new family of anti-cancer agents that reduce the limitations of conventional treatments. So far more than 3000 AMP's have been described, of which 217 have anticancer activity. Of the 12 families of plant AMP's, 3 of them have cytotoxic and anticancer activity: defensins, thionins and cyclotides. However, the mechanisms of cytotoxicity are poorly known. In this work, the cytotoxicity of plant defensins PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) and γ -thionin (*Capsicum chinense*) against the human chronic myeloid leukemia cell line K562 was evaluated and their mechanisms of action were analyzed. The PaDef and γ -thionin AMP's inhibited the viability of K562 cells in a concentration-dependent manner, with an $IC_{50} = 97.3 \mu\text{g/ml}$ and $290 \mu\text{g/ml}$, respectively. Both AMP's showed no cytotoxic activity on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). To establish the cytotoxic mechanism of defensins PaDef and γ -thionin, damage to the cellular membrane was evaluated, which was not affected by both defensins. On the other hand, the apoptosis induction was analyzed in the cells treated with the AMP's. The cells treated with PaDef showed 37.8% of cells in apoptosis, while in those treated with γ -thionin it was 30%, at 12 h. In addition, PaDef induced extrinsic apoptosis in K562 cells since it stimulated the caspase 8 mRNA expression levels (~2-fold) and its activity (92%). Additionally, PaDef induced the mRNA expression of TNF- α (~4-fold) and TNFR1 receptor (~10-fold), as well as the secretion of TNF- α to the medium at 24 h (17 pg/ml). On the other hand, γ -thionin defensin induced apoptosis in K562 cells through an independent caspase pathway. γ -thionin caused the loss of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), increased the intracellular calcium content and activated the calpains at short times (2 h). In conclusion, defensins PaDef and γ -thionin are cytotoxic for the leukemia cell line K562, inducing apoptosis through different pathways, which is a novel property for these plant defensins.

Keywords. Antimicrobial peptides; leukemia; K562; apoptosis; PaDef; γ -thionin

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1. Cáncer: características y epidemiología

El cáncer es un término general que se refiere a más de 100 enfermedades diferentes que afectan a muchos tejidos y tipos celulares. Sin embargo, todas las formas de cáncer se caracterizan por un crecimiento anormal de las células como resultado de un número relativamente pequeño de mutaciones genéticas heredadas o inducidas por el ambiente [1]. Las mutaciones y las modificaciones epigenéticas responsables del desarrollo del cáncer afectan principalmente 3 tipos de genes: genes supresores de tumores, protooncogenes y genes reparadores de DNA [2,3].

A nivel mundial este padecimiento es responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (O.M.S) señala que en 2015 fallecieron más de 8.8 millones de personas por esta enfermedad [4]. En el continente Americano fallecieron más de 1.3 millones de personas en 2012 por cáncer [5]; siendo el cáncer de próstata, pulmón, colorrectal y estómago las principales causas de muerte en hombres; mientras que en las mujeres destacan el cáncer de mama, pulmón, colorrectal y cervico-uterino [5-7]. En México, de acuerdo con la Unión Internacional Contra el Cáncer (U.I.C.C), el cáncer es la tercera causa de muerte, y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos [8], siendo el cáncer de próstata, pulmón, estómago e hígado los de mayor mortalidad en hombres, mientras que en las mujeres fue el cáncer de mama, cervico-uterino, hígado y estómago [5].

3.2. Leucemia: características y epidemiología

La hematopoyesis es la formación de los componentes celulares de la sangre, ocurre durante el desarrollo embrionario y durante la edad adulta para producir y reponer las células del tejido sanguíneo (**Figura 1**) [9]. La leucemia es un grupo de neoplasias generadas por alteraciones en los mecanismos de crecimiento, diferenciación y de muerte de las células progenitoras hematopoyéticas. Puede ser clasificada de acuerdo al linaje en: 1) linfoide (linfocitos B y T), y 2) mieloide (granulocitos, plaquetas y glóbulos rojos). Otra clasificación es en función del tiempo, con las categorías de aguda o crónica [10, 11].

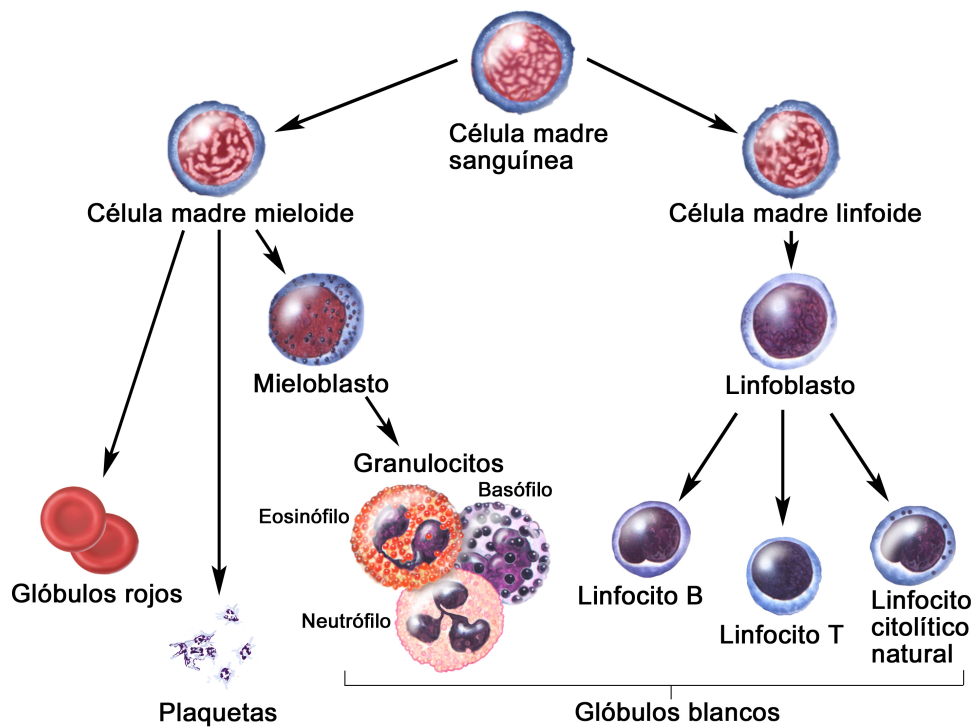


Figura 1. Hematopoyesis. A partir de una célula madre sanguínea se puede generar una célula madre mieloide, la cual dará lugar a la formación de glóbulos rojos, plaquetas o granulocitos. Así mismo, se puede producir una célula madre linfoide la cual podrá generar cualquier tipo de linfocito [12].

La leucemia representa el 10º lugar en mortalidad en el mundo con 265,471 muertes [4]. México, por su parte, ocupa el 6º lugar a nivel mundial con ~2,000 decesos por leucemia al año [4-5]. Los sectores de la población que mayormente son afectados por la leucemia comprenden los estratos poblacionales de 0-20 años y de 60-80 años [4, 13]. Recientemente, se ha observado una disminución importante en la mortalidad por leucemia en el mundo. No obstante, reportes internacionales muestran que México tiene la mayor tasa de mortalidad por leucemia en Latinoamérica [14]. La O.M.S estima que en México para el 2035 la incidencia de leucemia en menores de 65 años aumentará un 20% (de 5212 casos a 6537), mientras que en la población mayor de 65 años aumentará más de 150% (de 1113 casos a 2882), mientras que los decesos aumentarán un 28% (de 3087 decesos a 3965) y un 159.8% (1177 decesos a 1881) en estas poblaciones, respectivamente [5].

3.3. Leucemia linfoide (LL)

La leucemia linfoide o linfoblástica (LL) es una transformación maligna y proliferativa de las células progenitoras linfoides en la médula ósea (M.O), sangre y sitios extracelulares. Usualmente la LL invade rápidamente la sangre; sin embargo, también se puede diseminar a otras partes del cuerpo como los nodos linfáticos, hígado, riñones, sistema nervioso central y testículos, donde continúa creciendo y dividiéndose. Esta enfermedad se puede clasificar de acuerdo al curso de la enfermedad en aguda y en crónica. Además, es la leucemia más común en pacientes menores de 16 años, sin embargo puede aparecer en personas adultas mayores de 50 años [15].

Se han identificado síndromes genéticos los cuales predisponen en algunos casos el desarrollo de esta enfermedad, por ejemplo el síndrome de Down, la anemia de Falconi, el síndrome Bloom y el síndrome de ruptura de Nijmegen. Otros factores predisponentes para desarrollar la LL incluyen la exposición a radiación ionizante, a pesticidas, a ciertos solventes o infecciones virales como del virus de Epstein-Barr y o del virus de inmunodeficiencia humana. Para identificar a la LL se pueden utilizar las aberraciones cromosómicas, por ejemplo: t(12;21) [*ETV6-RUNX1*], t(1;19) [*TCF3-PBX1*], t(9;22) [*BCR-ABL1*]. Esta enfermedad puede clasificarse de acuerdo a la O.M.S en leucemia linfoblástica de células B no específica, leucemia linfoblástica de células B con anomalías genéticas recurrentes y en leucemias linfoblásticas de células T [16].

3.4. Leucemia mieloide (LM)

La LM es un desorden mieloproliferativo clonal resultado de la transformación neoplásica de una célula madre mieloide hematopoyética, afectando principalmente a los linajes celulares mieloide, monocítico, eritroide y megacariocítico [18, 19]. Al igual que la LL, la LM se origina en la médula ósea distribuyéndose por la sangre y esparciéndose en diferentes órganos del cuerpo. Adicionalmente, esta enfermedad se puede clasificar en aguda y crónica. En particular esta leucemia afecta principalmente a pacientes mayores de 60 años [15].

La LM tanto aguda como crónica se desarrollan más comúnmente en adultos. La mayoría de los pacientes previamente desarrollan algún tipo de alteración hematológica como consecuencia de la exposición a agentes alquilantes o radiación. La LM se caracteriza por el gran número de traslocaciones cromosomales por ejemplo t(8:21), t(15:17), t(9;22), así como de mutaciones en diferentes genes (por ejemplo: *FLT3-ITD*, *NMP1*, *CEBPA*) involucrados en la hematopoyesis (diferenciación y proliferación) provocando células mieloides pobremente diferenciadas. Su alta heterogeneidad citogenética permite clasificarla en diversos grupos (favorables, intermedios y de alto riesgo). Sin embargo, de acuerdo a la O.M.S la LM se clasifica en: leucemia mieloide aguda (con recurrentes anomalías genéticas, cambios relacionados a mielodisplasia, neoplasia mieloide relacionada a la terapia, sarcoma mieloide, proliferación mieloide relacionada a síndrome de Down) y leucemia mieloide crónica (crónica, atípica, juvenil) [17].

3.5. Leucemia mieloide crónica (LMC)

La LMC es un tipo de leucemia cuya progresión es lenta (proceso crónico), en donde el paciente tiene generalmente un gran número de células maduras, las cuales todavía pueden llevar a cabo sus funciones normales. Con la LMC las células cancerosas van sustituyendo en la M.O a las células que normalmente producen glóbulos rojos, blancos y plaquetas. Esta enfermedad es resultado de un daño adquirido (no presente en el nacimiento) en el ADN de las células de la M.O [15]. La LMC se caracteriza por la traslocación genética t(9;22)(q34;q11.2), la cual involucra la fusión de los genes *ABL1* del cromosoma 9q34 con el punto de ruptura y unión del gen *BCR* en el cromosoma 22q11.2, este nuevo arreglo es conocido como cromosoma Filadelfia. Este rearrreglo provoca la expresión de una oncoproteína de fusión BCR-ABL1, la cual es una tirosina-quinasa activa que promueve el crecimiento y replicación con señales apoptóticas aberrantes (**Figura 2**) [20]. La LMC tiene 3 diferentes fases: crónica, acelerada y blástica. La fase crónica es en un 50% asintomática y puede durar de 3-5 años; la fase acelerada es una fase transitoria en donde se manifiestan síntomas como fatiga, pérdida de peso, crecimiento del bazo y aparición de células blásticas en la sangre; y la fase

blástica tiene síntomas como pérdida de peso, fiebre, dolores de huesos, anemia, complicaciones con infecciones y hemorragias, así mismo una mayor infiltración de células inmaduras de tipo blástico en sangre y otros órganos [20, 21].

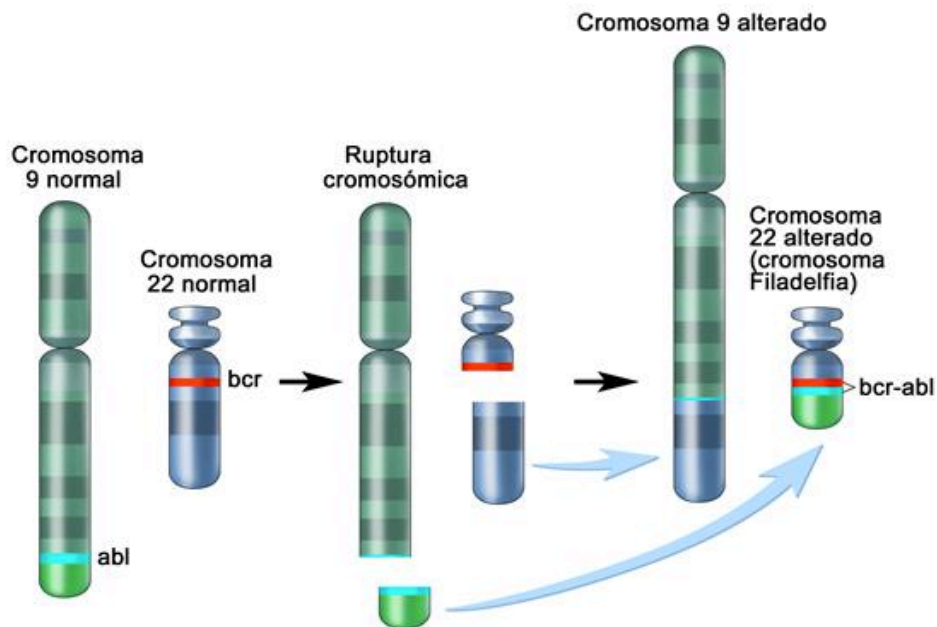


Figura 2. Formación del cromosoma Filadelfia. La traslocación de un fragmento del brazo largo del cromosoma 9 al cromosoma 22 provoca la formación de un cromosoma 22 modificado, denominado cromosoma Filadelfia. El resultado es la formación de un gen aberrante *bcr-abl* [22].

La información sobre la incidencia, prevalencia y mortalidad por la LMC es escasa en el mundo y en México debido a la ausencia de un registro de la enfermedad [4, 23]. Sin embargo, la LMC a nivel mundial representa el 15-20% de la leucemia diagnosticada, con una incidencia de 1-2 casos por cada 100,000 habitantes al año. Esta enfermedad afecta tanto a hombres como a mujeres (mayores de 60 años) [4, 20]. Además, la LMC es considerada la leucemia crónica más frecuente (3:1 con respecto a la leucemia linfocítica crónica).

En México, la LMC representa entre el 15-20% del total de la leucemia [24], colocándose en el 2012 en el octavo lugar en incidencia y mortalidad con 6,235 y 4,264 casos, respectivamente. La población mayormente afectada en

incidencia y mortalidad fueron los hombres (3,363 y 2,280 casos, respectivamente) con respecto a las mujeres (2,962 y 1,984 casos, respectivamente) [23].

3.6. Tratamientos contra el cáncer y leucemia

Existen diferentes tratamientos contra el cáncer tales como la cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, trasplante de médula ósea, los cuales se usan dependiendo del tipo y avance de la enfermedad. En su mayoría, los pacientes reciben una combinación de tratamientos [25]. Las terapias como la radiación y la quimioterapia son los métodos de elección más usados para tratar el cáncer [26]. La radioterapia mediante el uso de energía ionizante (rayos X, rayos gamma) destruye células cancerosas o retrasa su crecimiento al dañar su ADN [27], siendo relativamente precisa y es utilizada para lograr un control local. La quimioterapia consiste en el uso de medicamentos para tratar de manera sistémica a la enfermedad. Actualmente se usan más de 100 medicamentos para el tratamiento contra el cáncer. Estos son diferentes en su composición química, administración y efecto y actúan sobre las células cancerosas en diferentes etapas del ciclo celular. Los principales medicamentos son agentes alquilantes, antimetabólicos, antibióticos tumorales, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de mitosis y corticoesteroides [28]. El problema de la radiación y la quimioterapia a menudo es que son altamente tóxicos y tienen un amplio espectro de efectos secundarios graves (p. ej. anemia, alopecia, infertilidad, delirio, diarrea, dolor, edema, fatiga y náuseas) debido a que no son específicos y se dirigen a cualquier célula que se divida rápidamente sin diferenciar una célula sana de una maligna [29, 30].

La mayoría de los protocolos utilizados para el tratamiento de la leucemia dependen de la edad, peso, tipo de leucemia y grado de desarrollo de la enfermedad. Los dos principales tratamientos utilizados para el control de la leucemia son la quimioterapia y la radioterapia, aunque existen algunas alternativas como el trasplante de médula ósea, terapias dirigidas y anticuerpos monoclonales [30, 31]. La quimioterapia se usa por periodos cortos (1 año) o largos (2-3 años), y algunos de los medicamentos que comúnmente se usan son: vincristina, daunomicina, doxorubicina, arabinósido de citosina, L-

asparaginasa, etopósido y ciclofosfamida. En situaciones muy desfavorables para el paciente los trasplantes de médula ósea (alotrasplante) es la opción más utilizada; sin embargo, esta alternativa es muy difícil ya que la fuente de células madre es complicada, principalmente por la búsqueda de compatibilidad de donadores [31]. La terapia dirigida consta de medicamentos específicos para ciertos tipos de leucemia; por ejemplo, la LMC tiene la característica de tener un cromosoma anormal (cromosoma Filadelfia) la cual produce una proteína aberrante y que es un detonante para el desarrollo de la enfermedad, los medicamentos Imatinib (Gleevec) y Desatinic (Sprycel) actúan específicamente sobre las células que contienen este cromosoma. Para la leucemia mieloide aguda (LMA) se usa el Sorafenib que actúa sobre ciertos factores de crecimiento que se encuentran alterados en la enfermedad. Mientras que para la leucemia linfocítica crónica se han desarrollado medicamentos como la bendamustina, Ibrutinib (inhibidores de la tirosinasa de Bruton alterada en el padecimiento) e Idelalisib (bloquea una enzima llamada PI3K δ , clave para la sobrevivencia, crecimiento y expansión de los linfocitos B) [32, 33]. Además, se han desarrollado algunos anticuerpos monoclonales específicos tales como rituximab (Rituxan), alemtuzumab (Campath), epratuzumab, inotuzumab, y ozogamicina para tratar la leucemia linfocítica aguda. Lumiliximab, obinutuzumab y ofatumamab son ejemplos de anticuerpos desarrollados para tratar la leucemia linfocítica crónica, pero en su mayoría se encuentran todavía en prueba y por su reciente uso aún no se sabe la eficacia a largo plazo de éstos [34]. Existe un protocolo innovador en contra de la leucemia, el cual consiste en utilizar los linfocitos T del paciente y exponerlos a antígenos específicos de la leucemia que cursando el paciente y retornarlas al paciente, con la finalidad de que el propio sistema inmune destruya la enfermedad [35].

3.7. Nuevos tratamientos contra el cáncer

Existe una nueva generación de moléculas/tratamientos los cuales son utilizados como una terapia alternativa y complementaria para contrarrestar el cáncer, éstos incluyen a productos naturales como algunos péptidos antimicrobianos catiónicos híbridos y sintéticos de origen animal y de plantas (varios de ellos se encuentran en fase preclínica) [1, 36-38], a la terapia herbal

[39], a agentes alquilantes de DNA, a hormonas agonista/antagonistas y anticuerpos (sipuleucel T). Sin embargo, algunos de ellos aún se encuentran en fase experimental, son muy costosos y en algunos casos presentan una insuficiente selectividad [40-42]. Los nuevos tratamientos desarrollados (tratamientos de intervención) tienen la virtud de ser menos invasivos y con una disminución de los efectos secundarios, estos incluyen: ablación por radiofrecuencia (RFA), tratamiento laser, terapia fotodinámica, crioterapia, tratamiento de luz ultravioleta y ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU) [43].

3.8. Mecanismos de muerte celular (necrosis, apoptosis y otros mecanismos)

La necrosis y la apoptosis son los dos principales mecanismos de muerte celular, cada uno de ellos presentan moléculas iniciadoras-efectoras, rutas de señalización y mediadores claves característicos [44].

El término necrosis (del griego nekós “muerte”) considera la muerte celular pasiva. La necrosis ocurre de manera accidental e incontrolable como resultado de perturbaciones fisicoquímicas. Sin embargo, se ha sugerido que podría ser genéticamente controlada por diferentes escenarios fisiológicos y patológicos [45-49]. Las células necróticas morfológicamente experimentan hinchazón citoplasmática y de los organelos, la cual finaliza en la lisis de la membrana plasmática y la liberación del contenido intracelular, este evento favorece una respuesta inflamatoria [50, 51], con lo cual se provoca la muerte celular de células adyacentes, la atracción de células del sistema inmune y la generación de una cicatriz fibrosa [52, 53]. Existen varios mecanismos de activación de la necrosis; sin embargo, dependiendo del agente causal será la manera que inicie el proceso [54]. Por ejemplo, la despolarización de la membrana interna mitocondrial (mTP) tiene como consecuencia la interrupción de la producción de ATP y como resultado su agotamiento. Esta despolarización se debe al desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, al aumento de Ca^{2+} intracelular, fosfato inorgánico, pH alcalino del citoplasma y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) [55, 56]. Por otro lado, la presencia de ERO conduce al daño de ácidos nucleicos [57] y lípidos de membrana, ya sea de la membrana plasmática o intracelulares

[lisosomas, retículo endoplasmático (RE), mitocondria], lo cual provoca la pérdida de su integridad y ocasiona la liberación de su contenido (Ca^{2+} , proteasas). Por otra parte, la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} por entrada extracelular (resultado de la pérdida de función de los canales/bombas iónicas) o por liberación del RE puede provocar la activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} [58, 59].

Por otro lado, la apoptosis se define como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determina su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos [60, 61]. Es un tipo de muerte celular ordenada y silenciosa empleada por diferentes organismos durante el desarrollo, morfogénesis y homeostasis tisular. Las características morfológicas de la apoptosis incluyen la formación de vesículas o cuerpos apoptóticos en la membrana celular, contracción celular, condensación de la cromatina y concentración nucleosomal. Además, este proceso no provoca inflamación ya que los macrófagos reconocen, captan y eliminan los cuerpos apoptóticos [58]. La apoptosis se puede clasificar como apoptosis (clásica) dependiente de caspasas y apoptosis independiente de caspasas [62, 63]. La apoptosis clásica es mediada por las enzimas caspasas, una familia de cisteína-proteasas, las cuales se pueden clasificar en iniciadoras (caspasas 2, 8, 9, 10) y ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7).

Existen dos rutas de señalización en las cuales la apoptosis clásica provoca la muerte celular: la ruta intrínseca o mitocondrial, y la ruta extrínseca o extracelular [64-66]. La ruta intrínseca es usualmente activada en respuesta a señales de estrés intracelulares (daño al ADN, niveles altos de ERO, infecciones virales, activación de oncogenes), mientras que la ruta extrínseca es encendida por la unión de un ligando extracelular a un receptor de la membrana plasmática [58].

La ruta intrínseca, iniciada cuando existe estrés intracelular, induce la activación de la proteína BCL-2, la cual se oligomeriza en dos proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK, las cuales forman un poro en la membrana externa de la mitocondria. Esta permeabilización de la membrana externa mitocondrial causa la liberación de factores apoptóticos (Omi/HtrA2, Smac/DIABLO, citocromo-c), así como de la endonucleasa G al citoplasma. Además, se

genera un flujo de calcio y se liberan ERO. El citocromo-c se asocia con Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) el cual recluta y activa a la caspasa 9 formando un complejo heptamérico llamado apoptosoma. Subsecuentemente, la caspasa 9 activa a las caspasas ejecutoras que, a su vez, procesan sustratos celulares para finalmente destruir la célula (**Figura 3A**) [54].

La ruta extrínseca es activada por receptores de membrana (receptores de muerte) como CD95/APO-1/Fas, además de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF)/ligando inducido por apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) y sus ligandos (APO-1/Fas/TNF/TRAIL). Existen diferentes pares de receptores/ligando: Fas/FasL, TNF/TNFR1 y TRAIL/DR's. Tras la unión del ligando a su receptor de muerte, sus dominios citoplasmáticos (generalmente actúan como trímeros) atraen moléculas adaptadoras (típicamente FADD), lo que eventualmente permite la activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10, este complejo formado (FADD/Caspasa 8/10) se denomina complejo de señalización de inductor de muerte (DISC), el cual desencadena la escisión autoproteolítica [54, 58, 67, 68]. La caspasa 8 activada permite la ejecución de la apoptosis ya que ésta a su vez activa a las caspasas ejecutoras (caspasas 7, 3, 6) (**Figura 3B**) [54].

La apoptosis independiente de caspasas se caracteriza por ser ejecutada por las calpaínas, las cuales son proteasas citosólicas tipo cisteína. Esta familia de proteínas consta de 15 miembros, siendo la calpaína I (μ) y II (m) las de mayor interés biológico. La particularidad es que requieren calcio (proveniente del RE o del exterior) para su activación. Los procesos en los cuales están involucrados, además de las apoptosis, es en el ciclo celular, la adhesión, invasión, angiogénesis y en la formación, progresión y crecimiento del cáncer [69]. El mecanismo por el cual actúan estas proteasas involucra su interacción con miembros de la familia de proteínas pro apoptóticas Bcl-2, lo que resulta en la permeabilización de la membrana mitocondrial. La acción cooperativa de la calpaína y de la proteína Bax permite la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF), la cual es una flavoproteína pro apoptótica independiente de caspasas, su acción radica en la reducción de la actividad del complejo I en la mitocondria, además de trastocarse al núcleo y fragmentar a gran escala el ADN, así como la condensación de cromatina [70] (**Figura 4**).

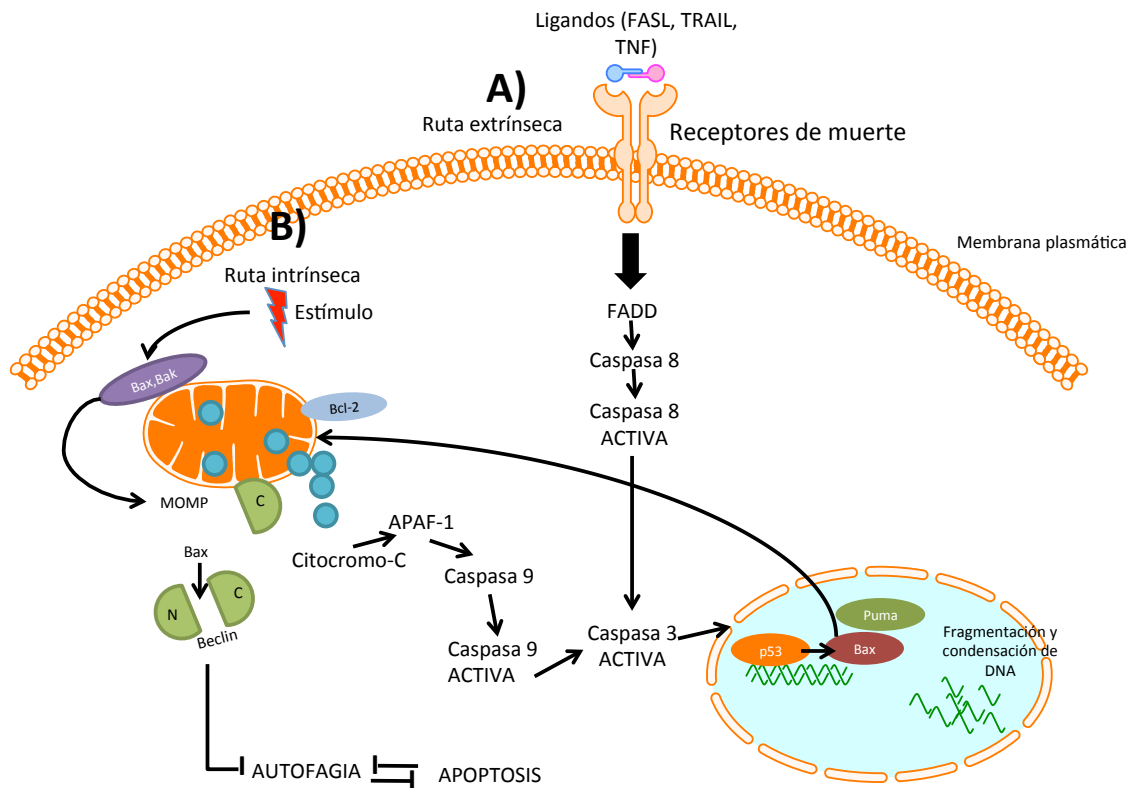


Figura 3. Apoptosis. A) Ruta de activación de la ruta extrínseca, en la cual participan los receptores de muerte, lo cual activa a la caspasa 8 y eventualmente conduce a la apoptosis. **B)** La ruta intrínseca está mediada por la mitocondria y la liberación de componentes como el citocromo-c para la activación de la caspasa 9. Ambas rutas convergen en la activación de la caspasa 3 y ejecutar la apoptosis. TRAIL (Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF), TNF (Factor de necrosis tumoral), BAX (Proteína X asociada a BCL-2), BAK (Proteína asesina antagonista homólogo BCL-2), MOMP (Porina mayor de la membrana externa), APAF-1 (Factor 1 activador de proteasas de apoptosis), PUMA (Modulador del P53 aumentado por apoptosis) [54].

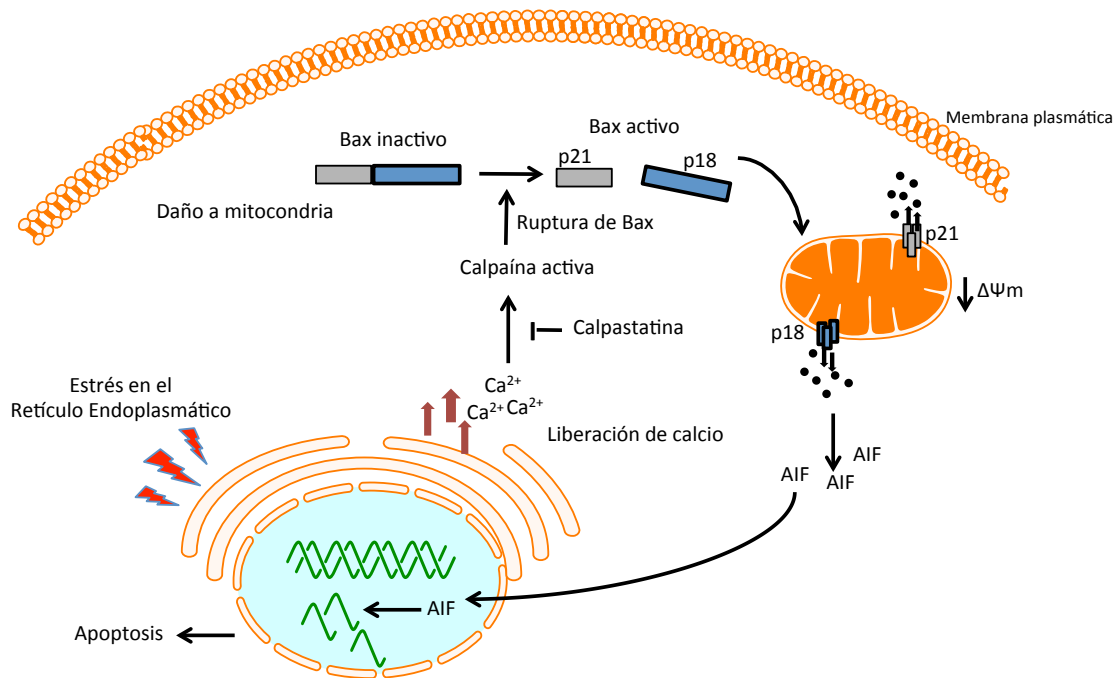


Figura 4. Apoptosis independiente de caspasas. En la activación de la apoptosis independiente de caspasas participa la calpaína, la cual activa a Bax y provoca la liberación del Factor de inducción de apoptosis (AIF) de la mitocondria, induciendo la apoptosis [70].

La autofagia es un proceso adaptativo altamente conservado en respuesta al estrés metabólico que da como resultado la degradación intracelular de proteínas y organelos (p. ej. mitocondria y retículo endoplasmático), siendo un proceso requerido en ciertos entornos en combinación con otras señales pro muerte; por lo tanto, no está considerado como un tipo de muerte celular [45, 46, 71, 72]. La autofagia se clasifica con base en las diferencias en el sustrato a degradar y el modo de entrega al lisosoma, el cual contiene hidrolasas digestivas. La macro-autofagia se refiere a la autofagia que involucra una vacuola de doble membrana denominada autofagosoma, que secuestra los componentes citoplasmáticos de una manera específica antes de fusionarse con una vacuola lisosomal [46]. La micro-

autofagia implica la captación directa de los componentes citoplasmáticos por la vacuola lisosomal, la cual puede funcionar de manera masiva o específica [46, 72, 73]. Finalmente, la autofagia mediada por chaperonas consiste en degradar proteínas reconocidas por motivos específicos y que son enviadas a un lisosoma por una proteína chaperona [74]. La autofagia que se relaciona con la muerte celular es la macro-autofagia, la cual inicia con la nucleación de una membrana aislada (fagoforo) que puede ser derivada de diferentes fuentes (membrana plasmática, retículo endoplasmático, aparato de Golgi o membrana mitocondrial) [75]. El fagoforo encierra las partículas diana para crear un autofagosoma, el cual posteriormente se unirá al lisosoma formando una estructura llamada autolisosoma o autofagolisosoma, en el cual se degradará el contenido [76].

La autofagia es regulada principalmente por mTOR (blanco de rapamicina en células de mamífero) y un regulador río arriba denominado AMPK (proteína activada por adenosina monofosfato), ambas fosforilan a ULK1 (cinasa I activadora de autofagia tipo UNC-51) también denominada ATG1, lo que resulta en la fosforilación de ATG13 y FIP200 para crear el complejo de iniciación. Este complejo en conjunto con Beclin-1 aumenta la actividad del complejo VPS34 que contiene ATG14-1, resultando en la nucleación [77]. En el proceso de iniciación existen dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina: el primero es el sistema ATG12-ATG5 (el cual forman un complejo llamado ATG16) [78, 79]; mientras que el segundo sistema a partir de ATG8 genera LC3-II [77, 78, 80]. Este último es muy importante debido a que participa en la unión de la carga al autofagosoma, y además, en el cierre de la fagoforo [81] (**Figura 5A**).

La necroptosis representa la muerte celular programada y regulada de la necrosis [82]. Esta muerte celular está regulada por receptores de muerte (TNFR1, FAS, TNFR2, TRAILR1 y TRAILR2) [83-86], por receptores de reconocimiento a patógenos (PRR) y por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) [87]. Esta ruta particularmente se activa particularmente cuando la apoptosis se ha sido bloqueado o existen bajos niveles de ATP. La ruta de activación y señalización mayormente estudiada es aquella mediada por TNF- α [88-92]. La inhibición o bloqueo de la caspasa 8, así como la

formación del complejo RIP1-RIP2-FADD, son cruciales para encender la necroptosis inducida por TNF- α . Este complejo de membrana provoca un mal funcionamiento de la mitocondria, lo que enciende al modulador esencial de NF- κ B (NEMO) [93]. El complejo RIP1-RIP2-FADD-NEMO induce la desintegración mitocondrial dependiente de BAX/BAK, lo que conduce bioenergéticamente a la muerte celular (por la disminución de los niveles de ATP) [82]. Adicionalmente, el encendido de RIP1 activa a la cinasa AKT, la cual a su vez junto con el regulador mTORC1 favorece la activación de la cinasa JNK y provoca la producción de TNF- α , potencializando la señal por su efecto autocrino [85,94,95] (**Figura 5B**).

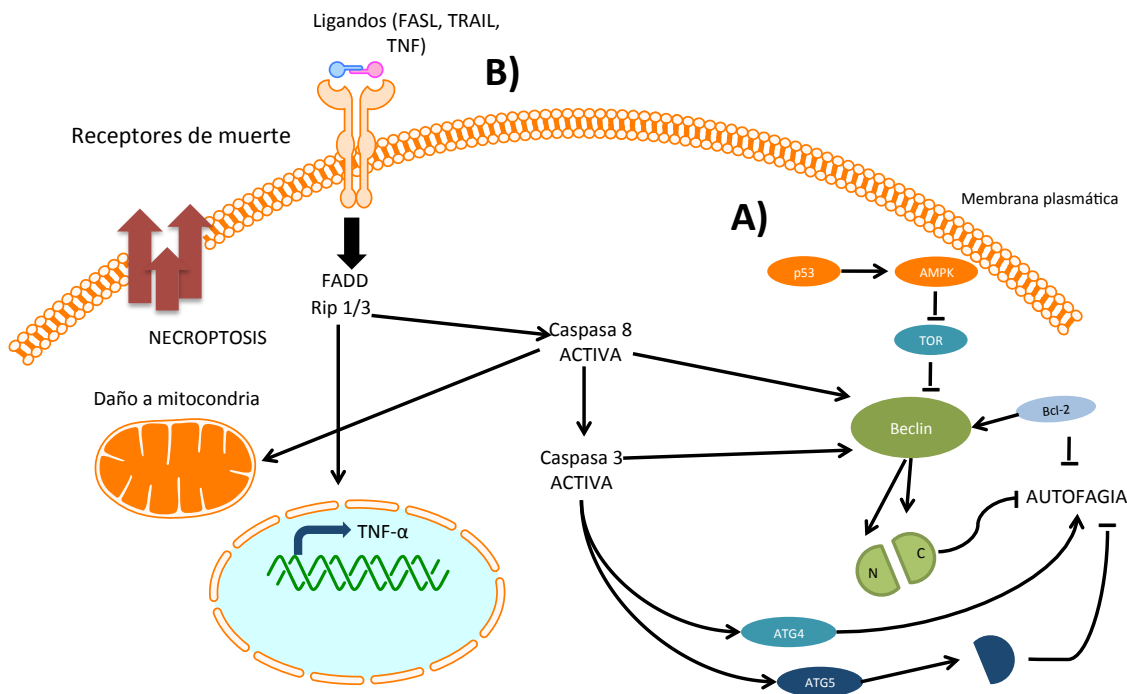


Figura 5. Autofagia y necroptosis. A) En la ruta de activación de la autofagia participan elementos como las caspasas 3 y 8, las cuales al ser activadas actúan sobre proteínas relacionadas en autofagia (ATG4) o a los reguladores (Beclin), este ultimo desbloqueado por la actividad de p53 sobre AMPK. B) La necroptosis se activa a través de los receptores de muerte interactuando con la proteína-cinasa que interactúa con receptores (Rip 1/3), teniendo como consecuencia modificaciones transcripcionales y mitocondriales [71,82].

La piroptosis (derivada del griego *pyros* “fuego” en referencia a la inflamación y fiebre producida, y *ptosis* “caer”) es otro tipo de muerte celular [96]. Este mecanismo solo se ha descrito en células dendríticas y macrófagos.

Morfológicamente la membrana plasmática aparenta ruptura y un fenómeno de sellado rápido derivando en la formación de vesículas en forma de balón alrededor del núcleo, manteniéndose la integridad nuclear, pero con fragmentación del ADN [97-99]. Además, las células experimentan un aumento de tamaño, lo cual resulta en la lisis celular y la liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular [99]. El mecanismo celular es dependiente de la caspasa 1; sin embargo, no se tiene totalmente descrito un mecanismo [54]. No obstante, existe evidencia de algunos pasos cruciales para su activación que incluyen a la flagelina o proteínas T3SS, cristales de fagocitosis y aperturas de poros en la membrana. Así mismo, se ha reportado que proteínas claves en la apoptosis clásica tales como la polimerasa ribosa poli-ADP (PARP) y la DNasa activada por caspasas (CAD) no se ven activadas, y que pasos cruciales como la inducción de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) no se ven afectadas [100, 101]. Igualmente, se demostró que la caspasa 1 se dirige a sustratos implicados en funciones celulares tan diversas como el mantenimiento del citoesqueleto, metabolismo del ATP, desintoxicación, tráfico, síntesis y degradación de ARN/proteína, transducción de señales, producción de citocinas (principalmente inflamatorias) y la segmentación e inactivación de enzimas de la glucólisis, vinculando esta muerte con la inactivación de las vías bioenergéticas [54, 102].

3.9. Péptidos antimicrobianos (PA's)

Los péptidos antimicrobianos son pequeños péptidos (12 a 100 aa) generalmente catiónicos (carga neta de +2 a +9) y anfipáticos, producidos por una amplia gama de organismos (animales, plantas, hongos, protozoarios, bacterias, arqueas) como parte del mecanismo de defensa contra organismos patógenos; adicionalmente se ha demostrado que tienen funciones de inmunomodulación, reparación de heridas, neutralización de endotoxinas, inducción de angiogénesis y actividad citotóxica [37, 103, 104]. Actualmente se han descrito un poco más de 3000 PA's (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Los PA's se pueden clasificar con base en su estructura secundaria en: 1) PA's con hélices- α (p. ej. cecropina), 2) PA's con β -láminas con uno o más puentes

disulfuro (p. ej. defensinas), 3) PA's con asas o loops (p. ej. tanatina) y 4) PA's extendidos (p. ej. indolicidina) (**Figura 6**). Esta diversidad de estructuras, tamaño, carga e hidrofobicidad son esenciales para su actividad [105-107].

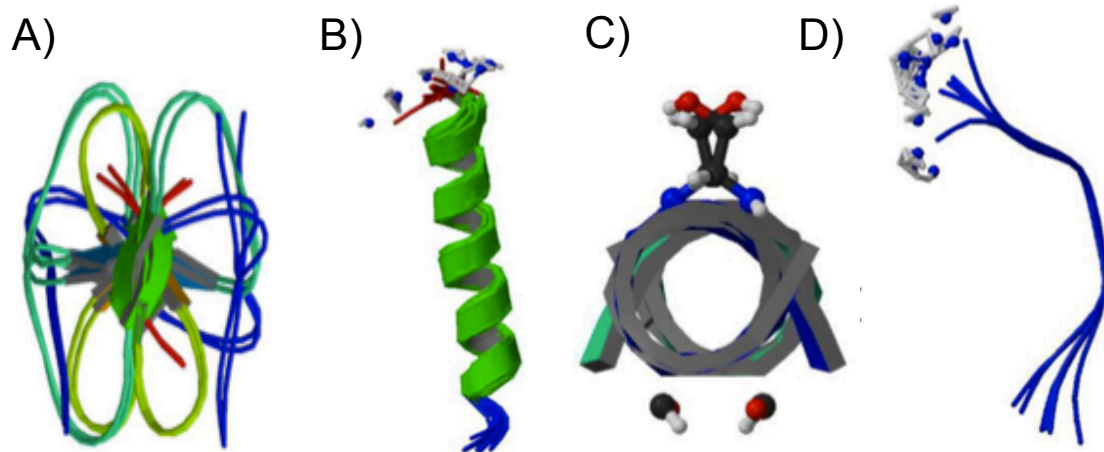


Figura 6. Clasificación de los PA's. La clasificación se basa en las características estructurales y su configuración. **A)** β -lámina, **B)** hélices- α , **C)** péptidos "loop" y **D)** péptidos extendidos [37].

3.10. Mecanismos de acción de los PA's

Los mecanismos de acción de los PA's incluyen: 1) Actividad membranolítica (lisis celular), y 2) No membranolítica. La actividad membranolítica es el mecanismo primario por el cual los PA's actúan e involucra la interacción electrostática del PA con moléculas de carga negativa presentes en la membrana celular [106]. Existen varios modelos propuestos para describir dicha actividad, entre ellos se incluyen el modelo de palo-barril y el de carpeta. En el modelo de palo-barril, los PA's se agregan en la superficie de la membrana formando agregados los cuales se insertan en la membrana y se orientan de tal manera que sus cadenas no polares interactúan con el núcleo hidrofóbico de los lípidos de la membrana, mientras que la superficie hidrofílica del PA queda expuesta hacia el exterior formando canales transmembranales causando la liberación del contenido intracelular. En el

modelo de carpeta, los PA's inicialmente se asocian en la superficie de la membrana y forman una alfombra local. Una vez que alcanzan una concentración umbral, el péptido desestabiliza la membrana lo cual conduce a la ruptura de la membrana celular (**Figura 7A**). Una variante del modelo de carpeta incluye el mecanismo llamado poro toroidal, donde el agregado de péptidos ocurre antes o después de unirse a la superficie de la membrana, induciendo la despolarización de la membrana debido a los poros de forma toroidal y a la formación de micelas (**Figura 7C**) [37, 106, 108].

Adicionalmente, los PA's pueden ejercer su actividad en blancos intracelulares (mecanismo no membranolítico). El PA puede ingresar por macropinocitosis, para ello la membrana plasmática de las células diana se pliega hacia adentro (se invagina) junto con el péptido y forma vesículas llamadas macropinosomas, las cuales posteriormente liberan a los péptidos en el citoplasma (**Figura 7B**), o en algunos casos trasladarse a través de la membrana celular. De esta manera los PA's inhiben diversos procesos esenciales tales como la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN), actividades enzimáticas, inhibición de la función ribosomal, bloqueo de proteínas chaperonas, interacción directa con la mitocondria inhibiendo la respiración celular, induciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la ruptura de la membrana mitocondrial, así como el bloqueo del ciclo celular (**Figura 8**). El mecanismo y ruta activada por los PA's dependerá de la secuencia de aminoácidos, composición de los lípidos de membrana y la concentración del péptido [36, 37, 109-112].

3.11. Citotoxicidad de los PA's

Un número creciente de estudios ha reportado el amplio espectro de actividad citotóxica de los PA's en contra de las células cancerosas [116]. Se han descrito ~200 PA's con dicha actividad (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Con base en su actividad citotóxica, los PA's se han clasificado en 2 grupos: 1) PA's tóxicos contra células cancerosas, pero no hacia células animales normales, y 2) PA's citotóxicos contra células cancerosas y células de mamífero normales [117]. La citotoxicidad de los PA's está asociada a la interacción del péptido con la célula a través de las cargas

negativas de moléculas que se encuentran en la membrana plasmática (fosfolípidos aniónicos y otros componentes como el fosfolípido fosfatidilserina, mucinas O-glicosiladas y sulfato de serina) [1, 38].

Los mecanismos de citotoxicidad descritos incluyen: La activación de la necrosis [38, 118, 119], apoptosis, inhibición del crecimiento tumoral y de la angiogénesis, inhibición de la replicación/síntesis de ADN, generación de ERO [116], inducción de autofagia [120] y cambios en el perfil metabólico [119]. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de PA's con actividad citotóxica.

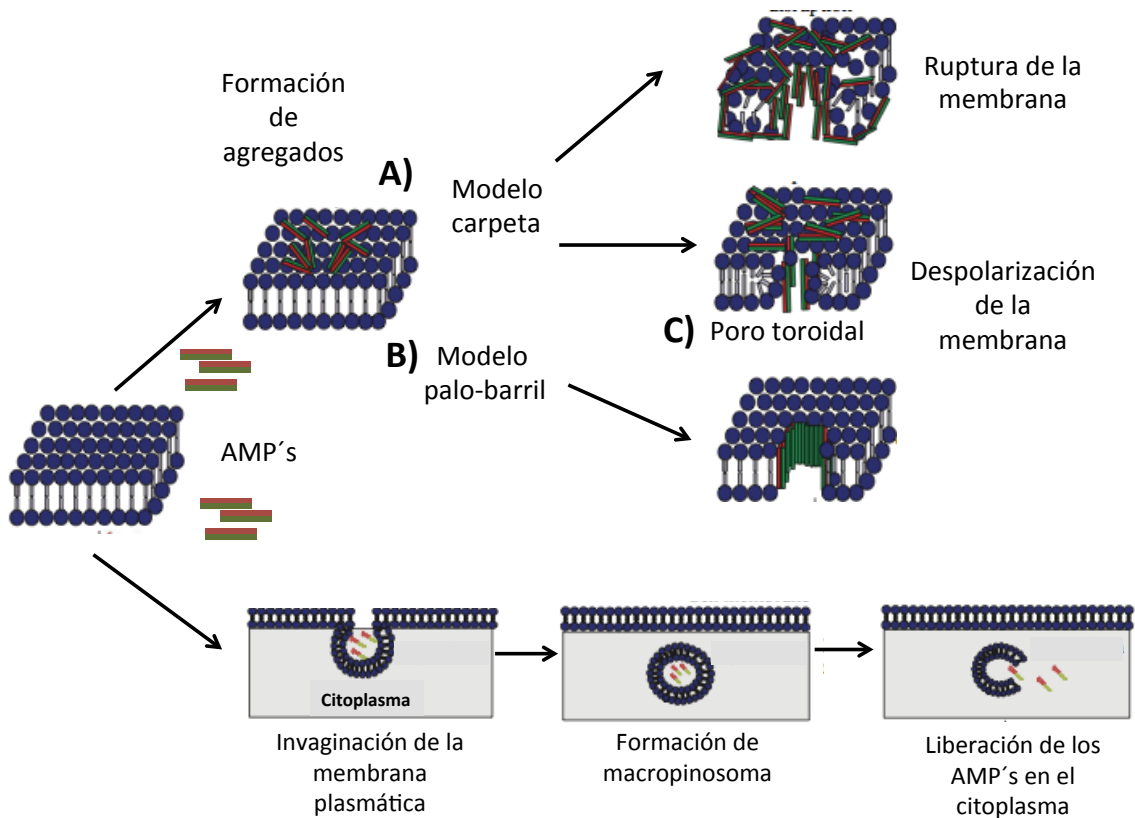


Figura 7. Mecanismos de acción de los PA's. **A)** El mecanismo membranólítico incluye el modelo de carpeta y palo barril, estos mecanismos se deben a las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, respectivamente, lo cual provoca la ruptura o despolarización de la membrana. **B)** En el mecanismo no membranólítico, el PA ingresa a la célula por invaginación, con la posterior formación de un macropinosoma y su liberación en el interior, actuando sobre diferentes blancos. **C)** El mecanismo de poro toroidal presenta una etapa previa al colapso de la membrana que incluye la formación de poros [113].

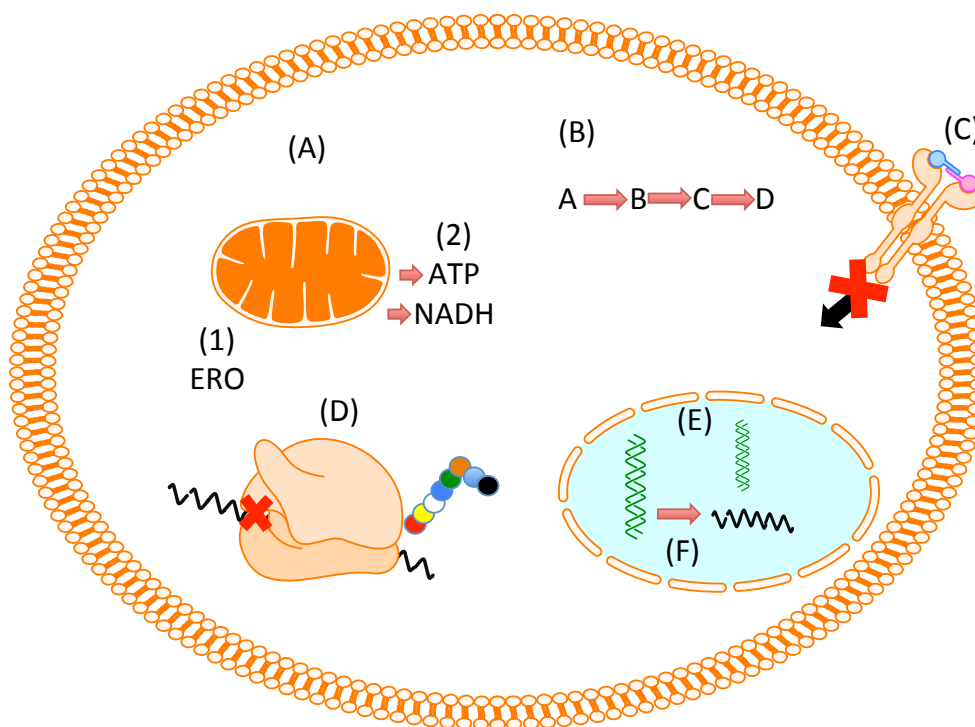


Figura 8. Blancos intracelulares de los PA's. Los PA's ingresan a la célula y pueden: **(A)** Interactuar sobre la mitocondria (1) induciendo la producción de ERO y el bloqueo en la producción de ATP (2). **(B)** Restaurar rutas metabólicas. **(C)** Inhibir/estimular enzimas necesarias para la comunicación de señales. **(D)** Inhibición de la función ribosomal y la síntesis proteica. **(E)** Inhibición de la síntesis de ADN y **(F)** ARN [36, 37, 109, 110, 114, 115].

3.12. Péptidos antimicrobianos de plantas (PAP's)

Los péptidos antimicrobianos de plantas (PAP's) forman parte de los mecanismos de defensa de las mismas (sistema inmune innato) [129, 130]. Han sido aislados de raíces, semillas, flores, tallos y hojas en una amplia variedad de especies. A los PAP's se les han descrito diversas funciones, entre las que se incluyen: actividad en contra de fitopatógenos [131], actividad inhibitoria contra enzimas [132], tolerancia a metales pesados [133], estrés abiótico [134] y efecto sobre el desarrollo vegetal [135]. Los PAP's son expresados constitutivamente o inducidos en respuesta a diferentes estímulos, y representan el 3% del repertorio de genes de plantas [136]. Hasta el día de hoy se han descrito ~300 secuencias de PAP's [137]. Una característica de los PAP's es que son ricos en aminoácidos cargados (p. ej. arginina, lisina, ácido

aspártico y ácido glutámico), los cuales son esenciales para su actividad [138, 139]. Tienen un peso molecular de 2-10 kDa y son principalmente básicos. Se han descrito 12 familias de PAP's: 1) tioninas, 2) defensinas, 3) ciclótidos, 4) Knottina-like, 5) shepherdins 6) MBP-1, 7) Ib-PA's, 8) LTP, 9) esnaquinas, 10) Heveina-like, 11) β -barrelinas, y 12) 2S-albumina. Sin embargo, solo las tioninas, defensinas y ciclótidos muestran actividad citotóxica en contra de células de mamífero y/o actividad anticancerosa hacia células de diferentes orígenes [36] (**Figura 9**).

Tabla 1. PA's con actividad citotóxica contra células cancerosas.

PEPTIDO	ORIGEN	CITOTOXICIDAD	MECANISMO	SELECTIVIDAD	REFERENCIA
MPI-1	<i>Polybia paulista</i>	EJ, PC-3, HEPG-2	Necrosis	Si	119
Polibia-MPI	<i>Polybia paulista</i>	Biu87, EJ y PC-3	Ruptura de la membrana celular con posible formación de poro	Si	119
Gomesina	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	B16F10-Nex2	Posible formación de poro	N.D.	121
NK-2	<i>Homo sapiens</i>	SW480, ATCC CCL-228) U-937 K-562 Jurkat MOLT-4	Necrosis, después de intercalación del péptido en membranas con alto contenido de fosfatidil serina	Si	122
Lactoferricina -B	<i>Bos taurus</i>	CCRF-CEM y Jurkat	Apoptosis por ruptura directa de la membrana mitocondrial	Si	123
Cecropina CB1	<i>Hyalophora cecropia</i>	HL-60, K-562, Jurkat CCRF-CEM y 3T6	Lisis de la membrana	N.D.	124
FK-16	<i>Homo sapiens</i>	LoVo, HCT116	Inductor de autofagia	N.D.	120
LL-37	<i>Homo sapiens</i>	HeLa, Jurkat	Inductor de apoptosis por vía clásica e independiente de caspasas	N.D.	70
NaD1	<i>Nicotiana glauca</i>	U937, Jurkat	Necrosis, interacción del péptido con el PIP2	N.D.	125,126
PaDef	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	MCF-7, K562	Inductor de apoptosis por vías clásicas	Si	127,128

N.D. No determinado

Tioninas

Son un grupo de PAP's pequeños (45-45 aa) con un peso promedio de 5 kDa, ricos en cisteína (6-8), arginina y lisina. Se caracterizan por formar entre 3-4 puentes disulfuro, su estructura general son dos hélices- α antiparalelas y

dos láminas β -plegadas antiparalelas. En su estructura sus 13 residuos de tirosinas son esenciales para la protección contra patógenos [141], adicionalmente actúan en la maduración de semillas, dormancia y germinación [142,143]. Se han identificado un poco más de 100 secuencias de tioninas en monocotiledóneas y dicotiledóneas [144]. Son expresados en diferentes tejidos (p. ej. semillas, hojas y raíces) [145-147]. El grupo representativo son las α - β tioninas que son péptidos catiónicos de 45-48 aa con 3 ó 4 puentes disulfuro [144]. Tienen actividad citotóxica en contra de bacterias, hongos, plantas, células animales y larvas de insectos [141, 148-150].

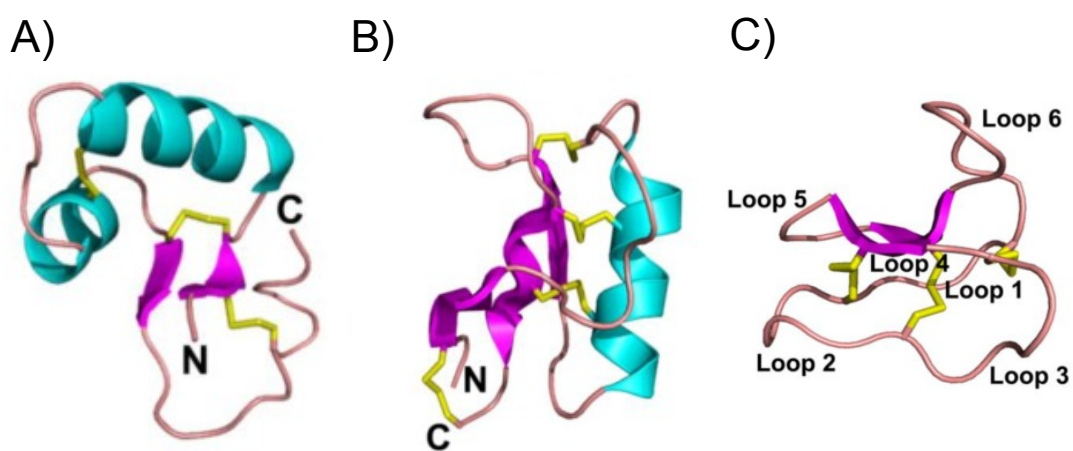


Figura 9. Estructura de los PAP's con actividad citotóxica. Las tres familias con actividad citotóxica incluyen; A) Tioninas, B) Defensinas, y C) Ciclotidos. Sus características estructurales son variadas, desde β -lámina-hélices- α y cíclico, respectivamente [39,140].

A la fecha se han descrito diversas tioninas con actividad citotóxica en células cancerosas y no cancerosas (**Tabla 2**). La pyrularia es una tionina aislada del muérdago (*Pyrrularia pubera*) la cual mostró actividad citotóxica contra células de cáncer (HeLa y B16) con una IC_{50} de 50 μ g/ml y normales (linfocitos, hepatocitos y eritrocitos). El mecanismo por el cual actúa esta tionina involucra alteraciones en la membrana celular, provocados por la despolarización y cambios en el flujo de calcio, lo que desencadena finalmente en la muerte celular [150]. La viscotoxina B2 es una tionina aislada del género *Viscum* spp, ésta mostró actividad citotóxica sobre células de cáncer (osteosarcoma de ratón) con una IC_{50} de 1.6 mg/ml [151]. Sin embargo, aunque no se probó de manera individual en células normales, una mezcla de

diferentes viscotoxinas (incluyendo B2) resultó en una baja citotoxicidad hacia este tipo de células [151]. La ligatoxina B, tionina aislada de *Poradendron liga*, cuya actividad citotóxica fue demostrada en células de linfoma (U937-GTB) y una variante multirresistente a fármacos de adenocarcinoma renal (ACHN), posee en su estructura un dominio de unión a ADN, el cual podría estar involucrado en la inhibición de la síntesis de ADN y proteínas [152]. Existen casos de tioninas cuya actividad depende de la naturaleza de la célula en la que actúa, tal es el caso del grupo de tioninas foratoxinas C, D, E y F (*Phoradendron tomentosum*). Por ejemplo, la foratoxina C mostró ser más activa que el resto de las tioninas, además de ser más efectiva sobre cultivos primarios de tumores sólidos que sobre células de tumores hematológicos [153].

En nuestro grupo de trabajo se demostró la actividad citotóxica de la tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre células de cáncer (MCF7, A549 y HeLa) y normales (epitelio mamario bovino y endotelio bovino), con un alto porcentaje de citotoxicidad (80-90%) [154].

Aunque las tioninas no muestran selectividad, tienen algunas características que llaman la atención como su efectividad hacia ciertos tipos de tumores (p. ej. foratoxina C) para su potencial uso contra el cáncer; sin embargo, se necesitan más estudios para entender su mecanismo de acción.

Defensinas

Es un grupo de péptidos antimicrobianos que se encuentran distribuidos principalmente en las familias *Brassicaceae*, *Fabaceae* y *Solanaceae*. Se han identificado en diferentes tejidos: semillas, hojas, flores, raíces y tubérculos [155-159]. Son péptidos pequeños (12-45 aa) con un peso de ~5 kDa, catiónicos en su mayoría y con la particularidad de contener de 8-10 cisteínas en su estructura que permite la formación de 4-5 puentes disulfuro, los cuales tienen la función de estabilizar esta molécula [36, 160]. Las defensinas tienen una estructura tridimensional conservada, que comprende una triple lámina- β y una hélice- α en paralelo. Estos PAP's pueden ser expresados durante la reproducción, en respuesta al estrés ambiental, así como en la respuesta de moléculas señal como el metil jasmonato, etileno y ácido salicílico [161]. Tienen

diversas funciones biológicas las cuales incluyen proteger al hospedero contra una amplia gama de microorganismos (bacterias, hongos) y enzimas (p. ej. α -amilasa, tripsina), así como la respuesta a estrés biótico, crecimiento y desarrollo de la planta [36, 162]. Las defensinas se clasifican con base en el número de cisteínas en 8C y 10C. La primera forma 4 puentes disulfuro y se incluyen defensinas como: NaD1 (*Nicotiana alata*), VrD1 (*Vigna radiata*), AlfAFP (*Medicago sativa*), Cp-thionin II (*Vigna unguiculata*), Rs-AFPs (*Raphanus sativus*), Psd1 (*Pisum sativum*), Fabatinas (*Vicia faba*) y Ms-Def1 (*Medicago sativa*); y finalmente la segunda forma 5 puentes disulfuro, donde se incluye a las defensinas PhD's (*Petunia hybrida*) [158].

Adicional a la actividad antimicrobiana, las defensinas de plantas muestran actividad citotóxica en contra de las células cancerosas (**Tabla 3**). Algunos ejemplos de defensinas con actividad citotóxica son: la sesquina de *Vigna sesquipedalis* que inhibe la proliferación de células cancerosas (MCF-7 y L1) a una concentración <0.1 mg/ml [163], la limenina (0.1 mg/ml) que afecta diferencialmente los linajes de células de leucemia murina M1 (60%) y L1210 (30%) [164]. Actualmente, la defensina NaD1 (*Nicotiana alata*) es la mejor descrita en cuanto a su mecanismo de acción sobre diferentes tipos de células cancerosas (U937, HeLa, MM170, Jurkat), el cual consiste en la desestabilización y permeabilización de la membrana celular, resultado de la interacción directa de la defensina con el fosfolípido de la membrana plasmática fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) [125, 126]. Por otro lado, la gimnina (*Gymnocladus chinensis* Baill) presentó actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de leucemia murina (L1210, M1) y hepatoma (HepG2) [165]. Sin embargo, todos los ejemplos anteriores no tienen reportes sobre su citotoxicidad en células normales. No obstante, existen ciertos estudios sobre defensinas de plantas probadas sobre líneas celulares normales. De manera general solo la lunatusina (*Phaseolus lunatus*) [166] y la defensina mitogénica (*Phaseolus vulgaris*) [167] mostraron citotóxicidad hacia células sanas. Contrario a esto, las defensinas de plantas coccinina [168], faseococina [169], γ -tionina [170], PaDef [127,128] y defensina "purple pole" [171], además de actuar sobre células cancerosas, no mostraron efecto sobre células normales, lo cual demuestra una posible selectividad de estos péptidos antimicrobianos

dependiendo de la naturaleza de la célula.

Ciclótidos

Son péptidos macro cíclicos (~30 aa), aislados principalmente de las familias de plantas *Rubiaceae* y *Violaceae*. Son altamente variables en secuencia; sin embargo, contienen seis cisteínas conservadas que estabilizan su estructura con la formación de puentes disulfuro [172]. La mayoría de los ciclótidos a pH fisiológico tienen carga neutra o débilmente positiva [173]. Se les atribuyen funciones de defensa del hospedero contra virus, helmintos, insectos, bacterias y efecto citotóxico [174]. Se dividen en dos grupos: Möbius y pulsera. Los tipos Möbius contienen un residuo cis-Pro en el loop 5 y un giro en la columna cíclica, mientras que el tipo de pulsera no lo presenta [175].

Se ha demostrado que los ciclótidos tienen actividad citotóxica tanto para células normales como para células cancerosas (**Tabla 4**), siendo la necrosis el principal mecanismo por el cual actúan [174]. Se han detallado algunos ejemplos de citotoxicidad sobre células cancerosas, el ciclótido cicloviolacina O2 (*Viola odorata*) tiene actividad sobre las células de linfoma U937 y sobre células HeLa de cáncer de mama [176], así como los ciclótidos viphi A, viphi F y viphi G (*Viola philippica*) que mostraron actividad sobre células MM96L (melanoma), HeLa (cáncer de mama) y BCG-823 (cáncer gástrico) [177]. Aunque los ciclótidos pueden tener actividad sobre células normales, se ha reportado que modificaciones en ciertos residuos de aa pueden disminuir este efecto [176], lo que ha permitido considerarlos para su posible uso terapéutico.

Tabla 2. Tioninas con actividad citotóxica.

NOMBRE	ESPECIE	LÍNEA CELULAR	ACTIVIDAD CONTRA CÉLULAS SANAS	ACTIVIDAD CONTRA CÉLULAS DE CÁNCER	REFERENCIA
Pyruularia	<i>Pyruularia pubera</i>	B16, HeLa,	Si	Si	[150]
Viscotoxina B2	<i>Viscum coloratum</i>	Yoshida	N.P	Si	[151]
Viscotoxina C1	<i>Coloratum ohwi</i>	Yoshida	N.P	Si	[178]
Ligatoxina B	<i>Phoradendron liga</i>	U937-GTB, ACHN	N.P	Si	[152]
Foratoxinas C,D,E y F	<i>Phoradendron tomentosum</i>	RPMI 8226-S RPMI 8226-LR5 RPMI 8226- dox40 U937 GTB U937 Vcr NCI-H69 NCI-H69 AR CCRF-CEM CEM-VM-1 ACHN	N.P	Si	[153]
Thi2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HeLa, A549, MCF-7	Si	Si	[154]
β -Purotionina	<i>Triticum aestivum</i>	P388	N.P	Si	[179]

N.P No probado

Tabla 3. Defensinas de plantas con actividad citotóxica.

NOMBRE	ESPECIE	LÍNEA CELULAR	ACTIVIDAD CONTRA CÉLULAS SANAS	ACTIVIDAD CONTRA CÉLULAS DE CÁNCER	REFERENCIA
Sesquina	<i>Vigna sesquipedalis</i>	MCF-7 y M1	N.P	Si	[180]
Limenina	<i>Phaseolus limensis</i>	L1210 y M1	N.P	Si	[181]
Lunatusina	<i>Phaseolus lunatus</i>	MCF-7	Si	Si	[182]
Defensina "purple pole"	<i>Phaseolus vulgaris</i>	HepG2, MCF-7, HT-29 y SiHa	No	Si	[183]
Coccinina	<i>Phaseolus coccineus var. Mayor</i>	HL-60 y L1210	No	Si	[184]
Faseococina	<i>Phaseolus coccineus</i>	L1210 y HL60	No	Si	[185]
γ -tionina	<i>Capsicum chinense</i>	HeLa	No	Si	[186]
NaD1	<i>Nicotiana glauca</i>	U937, HeLa, MM170, Jurkat	N.P	Si	[125,126]
TPP3	<i>Lycopersicon esculentum</i>	HeLa y U937	N.P	Si	[187]

Defensina mitogenica	<i>Phaseolus vulgaris</i>	MCF-7,	Si	Si	[188]
Vulgarinina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	MCF-7, L1210 y M1	N.P	Si	[189]
Nepalese	<i>Phaseolus angularis</i>	L1210, MBL12	N.P	Si	[190]
Gimnina	<i>Gymnocladus chinense Baill</i>	M1, HepG2 y L1210	N.P	Si	[191]
PaDef	<i>Persea americana</i> (var. <i>drymifolia</i>)	MCF-7, K562,	No	Si	[127,128]
AtPDF2.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HepG2	N.P	Si	[192]

N.P No probado

Tabla 4. Ciclotidos con actividad citotóxica.

NOMBRE	ESPECIE	LÍNEA CELULAR	ACTIVIDAD CONTRA CÉLULAS SANAS	ACTIVIDAD CONTRA CÉLULAS DE CÁNCER	REFERENCIA
Cicloviolacina O2	<i>Viola odorata</i>	U937	Si	Si	[176]
Viphi A,F y G	<i>Viola philippica</i>	MM96L, HeLa, BGC-823 y HFF-1	Si	Si	[177]
McoTI-I y II	<i>Momordica cochinchinensis</i>	LNCap, HCT116, PC3	N.P	Si	[193,194]
HB7	<i>Hedyotis biflora</i>	Capan2 y PANC1	N.P	Si	[195]
Ciclotidos T1-T4	<i>Clitoria ternatea</i>	HeLa	Si	Si	[196]
Vibi G y H	<i>Viola biflora</i>	U937	N.P	Si	[197]
Viba 15, 17 y Mram 8	<i>Viola philippica</i>	HFF1, MM96L, HeLa, BGC823 y HFF1	Si	Si	[177]
Kalata B1 y B2	<i>Ordenlandia affinis</i>	U937 GTB, HT29 y Ht116	Si	Si	[198]
Vitri A	<i>Viola tricolor</i>	U937 y RPMI-8226/s	N.P	Si	[199]
DC1-3	<i>Hedyotis diffusa</i>	PC3,DU145 y LNCap	N.P	Si	[200]
CT2, 4, 7,10, 12,19,20	<i>Clitoria ternatea</i>	A549	N.P	Si	[201]

N.P No probado

4. ANTECEDENTES

Los PA's son un grupo de péptidos anfipáticos y catiónicos, producidos por una gran variedad de organismos, siendo su principal función la protección del hospedero contra microorganismos patógenos [202]. Hasta el momento, se han descrito más de 3000 PA's (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), de los cuales 217 muestran actividad anticancerosa, de éstos el 28% provienen de plantas [138]. Los PA's de plantas son pequeñas moléculas (30-55 aa), ricas en cisteínas y con un peso molecular de 2-10 kDa [36]. Se han descrito 12 familias de PA's de plantas; sin embargo, solo las tioninas, defensinas y ciclótidos han mostrado actividad citotóxica hacia diferentes tipos de células (normales y cancerosas).

Las defensinas de plantas se han considerado como una opción muy atractiva por actuar sobre diferentes tipos de células cancerosas humanas (p. ej. HT29, MM170, MCF7, HL60, HeLa, U937, MCF7, Jurkat, K562) [36, 125, 127, 179] y no ejercer en su mayoría ningún efecto citotóxico sobre células normales, contrario a lo demostrado en las tioninas y ciclótidos [36].

En nuestro grupo de trabajo el análisis de las defensinas PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) y γ -tionina (*Capsicum chinese*) se inició utilizando un sistema de expresión heteróloga. Ambas defensinas se expresaron en una línea inmortalizada de endotelio de cordón umbilical de bovino (BVE-E6E7). Los ensayos de actividad se realizaron usando una mezcla de proteínas producidas por la célula que incluía la defensina recombinante (medio condicionado). Con ello se demostró que PaDef ejerce actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con porcentajes de inhibición de >90% y 85%, respectivamente; sin embargo, la actividad citotóxica no se analizó. Mientras que para γ -tionina se demostró su actividad antifúngica sobre *Candida albicans* (>70%), y su efecto citotóxico en células cancerosas humanas HeLa con una actividad de 80% de inhibición [153, 103].

Para establecer un modelo de estudio con menos variantes, se recurrió a la síntesis química de ambas defensinas. Utilizando los péptidos sintetizados químicamente, recientemente se demostró la citotoxicidad y mecanismo de acción de las defensinas γ -tionina y PaDef sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7. En el caso de γ -tionina se obtuvo una IC₅₀ de 117.29 μ g/ml, con

la cual se observó que indujo la muerte celular a través de la apoptosis tanto por vía extrínseca como intrínseca [203]. Mientras que la IC_{50} de PaDef para esta línea celular fue de 141.62 $\mu\text{g/ml}$, la cual indujo la apoptosis por vía intrínseca [128]. Diferentes reportes han demostrado que las defensinas de plantas poseen selectividad hacia células cancerosas (defensina “purple pole”, coccinina, faseococina,) [127, 166, 168, 171]. En concordancia, las defensinas γ -tionina y PaDef no afectaron a células sanas de epitelio mamario bovino y células mononucleares humanas [128, 203].

5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la tercera causa de muerte en el mundo, y la leucemia se incluye dentro de los 10 principales cánceres por su alta incidencia y mortalidad [204, 205]. Los procedimientos generales (p. ej. quimioterapia, radioterapia) y específicos (p. ej. fármacos específicos) empleados en la actualidad tienen diferentes limitaciones ya que muestran bajos índices terapéuticos, son altamente tóxicos y presentan un amplio espectro de efectos secundarios [166, 206]. Los nuevos tratamientos anticancerosos están dirigidos a mejorar las diferentes limitaciones que poseen los procedimientos generales. La apoptosis (muerte celular programada) es el principal mecanismo que se busca estimular debido a que no provoca una respuesta inflamatoria en el paciente [58, 206, 207, 212-214], esto es importante ya que el cáncer genera un estado inflamatorio exacerbado. Sin embargo, se requiere comprender las rutas de señalización que podrían activarse o apagarse por efecto de los diferentes tratamientos [58, 206, 207]. Este conocimiento puede derivar en una mejora de las terapias utilizadas en contra de esta enfermedad.

La heterogeneidad genética de cada tipo de cáncer complica en gran medida el perfeccionamiento de un tratamiento único [208]. En el desarrollo de nuevos fármacos para su posible uso en contra del cáncer, el uso de líneas celulares ofrece varias ventajas, entre las cuales destaca principalmente proporcionar una población definida de células (homogeneidad genética) lo cual permite la reproducibilidad de resultados [209]. Para tal efecto, la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica de humanos, es uno de los modelos de elección para realizar aproximaciones experimentales. Su translocación genética característica $t(9;22)(q34;q11.2)$ y el mecanismo de acción de su proteína de fusión (BCR-ABL), permite entender más a detalle los posibles blancos y efectos de nuevas moléculas para su posible uso terapéutico. Es de resaltar que la mayoría de los estudios se centran principalmente en líneas celulares cancerosas de tipo adherente (derivadas de tumores sólidos), y son pocos los estudios en líneas derivadas de tumores hematológicos, sobre todo de leucemia humana, por lo que los resultados de este trabajo contribuirán a ampliar el conocimiento de los mecanismos de citotoxicidad activados en este tipo de células.

Recientemente, los péptidos antimicrobianos (PA's) han tomado un importante lugar como opción terapéutica contra el cáncer [137]. Los PA's tienen ventajas con respecto a algunos fármacos utilizados actualmente en la terapéutica, tales como su tamaño pequeño, facilidad para sintetizarlos, habilidad de penetrar la membrana celular, especificidad y baja inmunogenicidad [201, 210], esto favorecería en gran medida contar con tratamientos eficaces y menos tóxicos. De los 3,014 AMP's descritos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), solo 217 han mostrado actividad anticancerosa. Los productos naturales derivados de plantas han hecho grandes contribuciones en el desarrollo de medicamentos quimioterapéuticos contra el cáncer [211]. Algunos PA's de plantas han llamado la atención por su actividad sobre células cancerosas; no obstante, hasta el momento solo se tienen registrados 38 péptidos con actividad citotóxica [137]. Adicionalmente, la familia de defensinas de plantas ha demostrado cierta selectividad hacia las células cancerosas (**Tabla 3**).

En general los mecanismos de citotoxicidad de los PA's de plantas no se conocen detalladamente. No obstante, reportes como los descritos en las defensinas de plantas NAD1 y TPP3 de *Nicotiana glauca* y tomate, respectivamente, mostraron que ambas defensinas poseen un mecanismo citotóxico hacia células cancerosas de tipo membranolítico mediado por una interacción específica con el fosfolípido de la membrana plasmática fosfatidil inositol 4-5 bifosfato formando estructuras tipo vesículas [125,126]. En el mismo sentido, en nuestro grupo de trabajo se describió el mecanismo citotóxico por el cual la defensina PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) induce la muerte de las células MCF-7 (derivada de cáncer de mama), el cual ocurre a través de la apoptosis por vía intrínseca [128]. Es de resaltar que la mayoría de los estudios de citotoxicidad se centran principalmente en líneas celulares cancerosas de tipo adherente y son muy pocos los estudios en líneas celulares de leucemia humana.

Por lo anterior, en este trabajo se analizó el mecanismo de citotoxicidad de las defensinas PaDef y γ -tionina sobre la línea celular de leucemia mieloide crónica humana K562.

6. HIPÓTESIS

Los péptidos antimicrobianos de origen vegetal PaDef y γ -tionina tienen un efecto citotóxico contra la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica humana, a través de la inducción de apoptosis.

7. OBJETIVOS

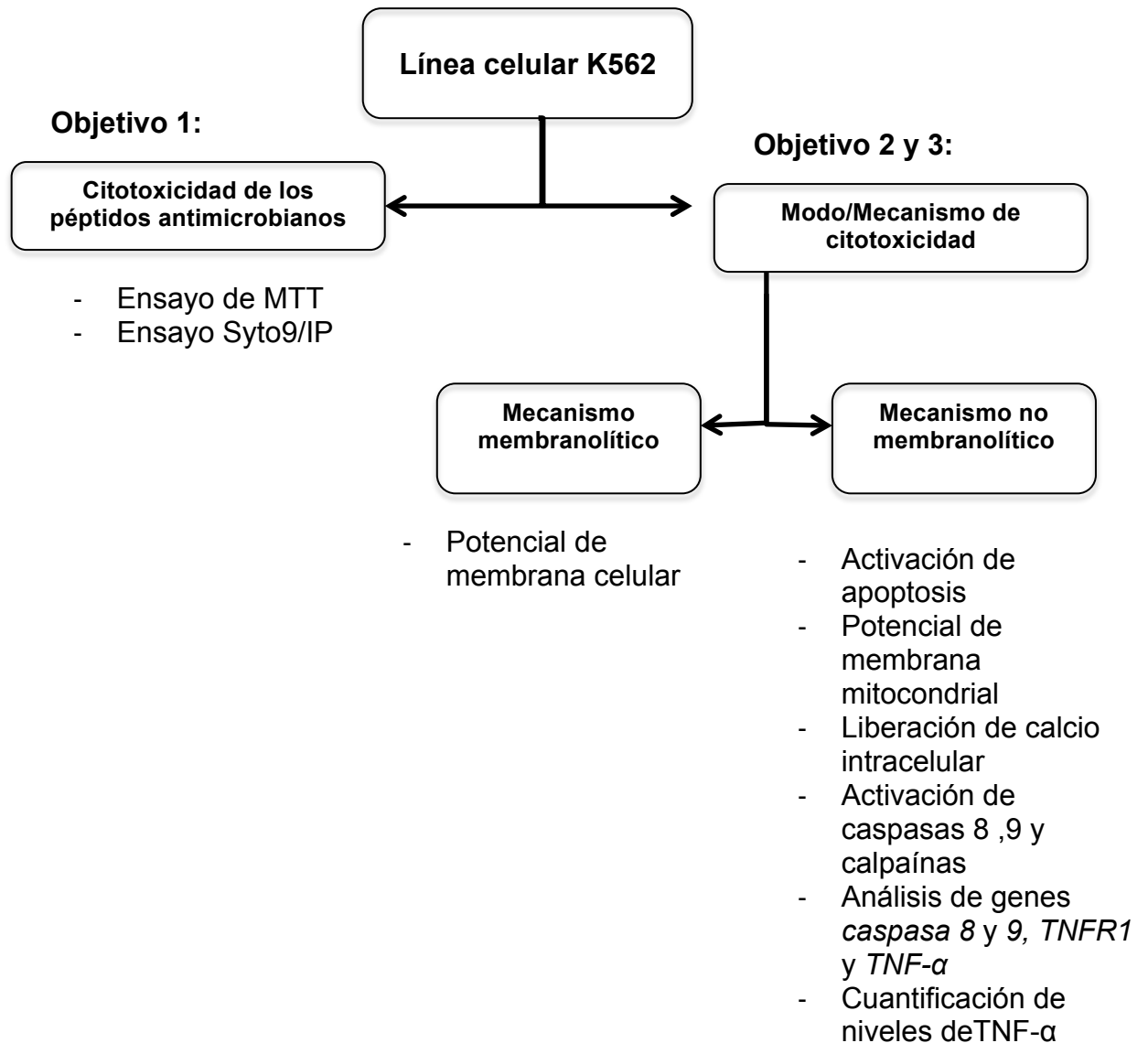
7.1. General

Evaluar la citotoxicidad de los péptidos antimicrobianos de origen vegetal PaDef y γ -tionina contra la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica humana, y determinar su mecanismo de acción.

7.2. Específicos

1. Determinar la citotoxicidad de las defensinas (PaDef y γ -tionina) contra la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica humana.
2. Evaluar el modo de acción de los péptidos antimicrobianos de origen vegetal (PaDef y γ -tionina) en la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica humana.
3. Establecer el mecanismo de citotoxicidad activado por los péptidos antimicrobianos de origen vegetal (PaDef y γ -tionina) en la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica humana.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. RESULTADOS

Los resultados se presentan en 3 capítulos.

1) El capítulo I corresponde al artículo de investigación original

- **Flores-Alvarez, L.J., Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A. and Joel E. López-Meza. 2018.** PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 99C:10-18. doi: 10.1016/j.biocel.2018.03.013.

2) En el capítulo II se presentan los resultados del mecanismo de citotoxicidad de γ -tionina sobre las células K562

- A novel cell death mechanism for the antimicrobial peptide γ -thionin from habanero chile (*Capsicum chinense*) on human K562 chronic myeloid leukemia cells.

3) El capítulo III corresponde al artículo de divulgación

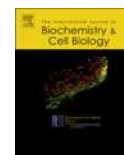
- **Luis José Flores Alvarez y Joel Edmundo López Meza. 2016.** “Pasado, Presente y Futuro de la Guerra contra el Cáncer” (Artículo de Portada). *Saber Más*, revista de divulgación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Año 5, Número 28. ISSN: 2007-7041.

9.1. CAPÍTULO I.

PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biochemistry
and Cell Biologyjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biocelPaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis

Luis José Flores-Alvarez, Jaquelina Julia Guzmán-Rodríguez, Rodolfo López-Gómez, Rafael Salgado-Garciglia, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Joel E. López-Meza*

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Leukemia
Antimicrobial peptide
Apoptosis
PaDef defensin

ABSTRACT

Plant defensins, a group of antimicrobial peptides, show selective cytotoxicity toward cancer cells. However, their mechanisms of action remain poorly understood. Here, we evaluated the cytotoxicity of PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) on K562 chronic myeloid leukemia cells and analyzed the pathway involved in the induction of cell death. The defensin PaDef was not cytotoxic against human PBMCs; however, it was cytotoxic for K562 cell line ($IC_{50} = 97.3 \mu\text{g/ml}$) activating apoptosis at 12 h. PaDef did not affect the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$), neither the transmembranal potential or the release of intracellular calcium. Also, PaDef induced gene expression of caspase 8 (~2 fold), TNF- α (~4 fold) and TNFR1 (~10 fold). In addition, the activation of caspase 8 was detected at 24 h, whereas caspase 9 activity was not modified, suggesting that the extrinsic apoptosis pathway could be activated. In conclusion, PaDef induces apoptosis on K562 cells, which is related to the activation of caspase 8 and involves the participation of TNF- α , which is a novel property for a plant defensin.

1. Introduction

Cancer is a major cause of death worldwide. The leukemias are including in the ten most important types of cancers for their incidence and mortality (Ferlay et al., 2015). The American Cancer Society estimates about 8950 new cases of chronic myeloid leukemia (CML) in the United States for 2017. Recent treatments to CML (e.g. tyrosine kinase inhibitors) provide a notable therapeutic progress; however, these approaches shown side effects and their long-term safety profile is unknown (Pasic and Lipton, 2017). These limitations have led to the search for new therapeutic alternatives to CML. An attractive alternative is the use of antimicrobial peptides (AMP), which shown cytotoxic properties (Al-Benna et al., 2011; Pushpanathan et al., 2013; Riedl et al., 2011).

The AMP are small peptides (12 to 100 aa), generally cationic and amphipathic that are produced by many organisms as part of their defense mechanisms against pathogens (Cederlund et al., 2011; Peters et al., 2010). Today, more of 2900 AMP have been described (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), and ~7% of them are cytotoxic to cancer cells. This cytotoxicity has been associated to the peptide interaction with cancer cells through the negative charged membrane phospholipids, that mainly leads to necrosis (e.g., Dermaseptin B2, D-K₆L₉, MPI-

1) (Papo et al., 2006; van Zoggel et al., 2012; Zhang et al., 2010), or apoptosis (e.g., BMAP-28) (Risso et al., 2002). Additionally, other cytotoxic mechanisms have been reported including tumor growth inhibition and angiogenesis (Koskimaki et al., 2009), DNA synthesis/replication inhibition (Kuriyama et al., 2013; Ourth, 2011), reactive oxygen species (ROS) generation (Gao et al., 2013), DNA damage and autophagy induction (Ren et al., 2013) and changes in the metabolic profile (Kuroda et al., 2015). These mechanisms essentially have been described for AMP from animals; however, the cytotoxic mechanisms for plant AMP are poorly understood.

Plants AMP are small peptides of 40–50 aa (3–10 kDa) rich in cysteine, which are grouped in twelve families that shown mainly bactericidal and fungicidal activity (Lay and Anderson, 2005; Thomma et al., 2002). However, thionins, defensins and cyclotides families contain AMP cytotoxic for cancer cells (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). In particular, plant defensins have drawn attention due to their selectivity toward cancer cells. Nevertheless, there are few studies that describe in detail the mechanisms of induced cell death for plant defensins. Recently, a non-apoptotic cytotoxic mechanism for the plant defensins NaD1 (*Nicotiana glauca*) and TPP3 (*Lycopersicon esculentum*) was reported, in both cases the binding of the AMP to the plasma membrane phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate was

* Corresponding author.

E-mail address: elmeza@umich.mx (J.E. López-Meza).<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.013>

Received 18 November 2017; Received in revised form 3 March 2018; Accepted 16 March 2018

Available online 17 March 2018

1357-2725/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Sequence of primers used in this study.

Gene	Sequence	Tm(°C)	Product size (pb)	Reference
TNF- α	5' CCCCTGGAGATAACCTCCCA 3' 5' CAGACGGGAGACAGGAGAGC 3'	55.5	101	Mookherjee et al. (2006)
TNFR1	5' CGTACCAACGGTGGGAAGTC 3' 5' CAAGCTCCCCCTCTTTTCAG 3'	56	76	Cubillas et al. (2010)
Caspase 8	5' AGATCTGGCCCTCCCTCAAGTTCCT 3' 5' AAATTTGAGCCCTGCGCTGGTGTCT 3'	66	244	Guzmán-Rodríguez et al. (2016)
Caspase 9	5' AGGACATGTGGCTTCGTTTCTG 3' 5' CCAAATCTCCAGAACCAATGTCC 3'	66	257	Guzmán-Rodríguez et al. (2016)
β -actin	5' AAAACCTAACTGGCGCAGAAAACA 3' 5' TGTCACTTCACCGTTCACACTTT 3'	57	317	Guzmán-Rodríguez et al. (2016)

involved (Baxter et al., 2015; Poon et al., 2014).

In a previous study, we isolated the cDNA of PaDef defensin from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) and demonstrated its antimicrobial activity (Guzmán-Rodríguez et al., 2013). Further, we showed that this defensin induces intrinsic apoptosis pathway in breast cancer cell line MCF-7 (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). In this work, we show evidence that PaDef defensin is also cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through the activation of the extrinsic apoptosis pathway, which is a novel property for this AMP.

2. Material and methods

2.1. Peptide

In this study, we used the mature region of the PaDef defensin (ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCHGEHFTDGRCCQGVRRRCMCLKPC, 47 aa). This AMP was chemically synthesized (BIOMATIK) and the disulfide bond formation was completed as described (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). The AMP was dissolved in DMSO 20% and the final concentration of vehicle for all of the experiments was 0.39%, which was used as control. The cytotoxicity of PaDef defensin was evaluated at a range of concentration of 10–200 μ g/ml, according to previous report (Mader et al., 2005).

2.2. K562 cell culture

The human K562 chronic myeloid leukemia cells was obtained from American Type Culture Collection. Cells were routinely cultured in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Corning) and 100 U/ml penicillin and streptomycin (Gibco) and grown in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

2.3. MTT viability assay

The cytotoxicity of PaDef defensin on K562 was assessed by MTT assay as described (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). Briefly, K562 cells were synchronized in RPMI-1640 medium without serum (12 h). 2×10^5 cells/well cultured in 96-well flat-bottom plates were treated with PaDef (10–200 μ g/ml) or vehicle and incubated during 12–24 h. Further, 10 μ l of MTT solution (5 mg/ml, Sigma) in phosphate buffer saline (PBS) was added to each well and incubated during 4 h at 37 °C. Finally, formazan crystals were dissolved with acid isopropanol (100 μ l, 95% isopropanol and 5% of 1 N HCl). The absorbance lectures were performed in a microplate reader (Bio Rad) at 595 nm. Actinomycin D (Act-D) was used as cell death positive control. Cell viability results are reported as the percentage of viable cells with respect to cells treated with the vehicle (DMSO 0.39%). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by regression analysis using Excel (Microsoft) and corroborated by flow cytometry with SYTO[®] 9 green-fluorescent nucleic acid stain and propidium iodide in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) according to the manufacturer's

instructions. For the rest of the experiments we used the IC₅₀.

2.4. Calcium efflux testing

Calcium efflux was assessed in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) using the Calcium Assay Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. For this, K562 cells (1×10^5 cells/ml) cultured in RPMI-1640 medium were incubated with the indicator dye for 1 h. Previous to add the treatments (PaDef IC₅₀ or vehicle), we established a baseline fluorescence during 3 min. After treatments, the fluorescence intensity was monitored by flow cytometry for other 3 min. Phorbol myristate acetate (3 μ M; PMA, Sigma) was used as a positive control.

2.5. Measurement of the transmembrane potential

Changes in the transmembrane potential of K562 cells were evaluated using the DiSC3(5) dye (3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, Sigma) as described (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). Briefly, K562 cells (1×10^5 cells/well) seeded in 96-well black-wall plates were incubated with DiSC3(5) 0.2 mM (dissolved in Hank's HEPES buffer) for 30 min in a CO₂ incubator. Then, the treatments (PaDef IC₅₀ and vehicle) were added and the fluorescence intensity was monitored for 2 h using a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific). Valinomycin (0.2 mM, Sigma) was used as a positive control.

2.6. Apoptosis and caspase activation

The apoptosis rate was determined using Annexin V and 7AAD according to the manufacturer's instructions (Annexin V, Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen) in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The data were analyzed with the FlowJo v10.4 software (TreeStar, Inc.). A total of 10,000 events were collected. Actinomycin D (Sigma, 80 μ g/ml) was used as a positive control for apoptosis.

The activation of caspases 8 and 9 was determined using the Caspase-Glo 8 and 9 kit (Promega) according to manufacturer's instructions. For this, K562 cells (6×10^4 cells/well) seeded in white 96-well plates were incubated with PaDef IC₅₀ or vehicle in serum-free medium during 12–24 h. Further, the caspase substrates were added and the luminescence was registered using a Varioskan spectrophotometer. Also, K562 cells were incubated with the caspase 8 inhibitor Ac-IETD-CHO (100 μ M, Sigma) for 1 h and then treated with PaDef IC₅₀ by 24 h and apoptosis rate was determined as described above. Actinomycin D (80 μ g/ml) was used as positive control.

2.7. Assessment of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The effect of PaDef defensin on the $\Delta\Psi_m$ of K562 cells (1×10^5 cells/well) was measured using the JC-1 dye (BD Biosciences) in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) as described (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). The dye indicator allows to differentiate

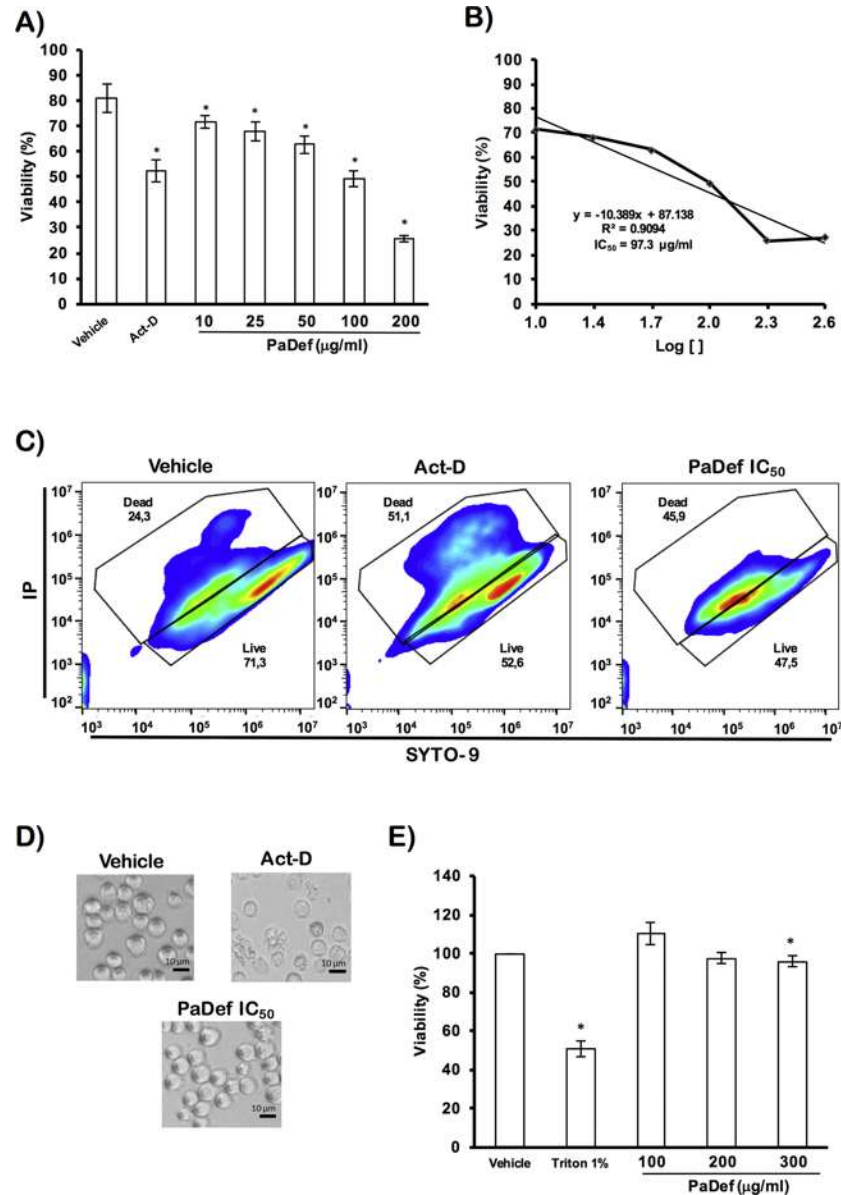


Fig. 1. PaDef defensin from avocado is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells. (A) Cytotoxicity of PaDef on K562 cells. Viability of cells treated with PaDef defensin (10, 20, 50, 100 and 200 µg/ml) was assessed by MTT assay at 24 h. Data are shown as the percentage of viable cells with respect to cells treated with vehicle (DMSO 0.39%). *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$). (B) The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of PaDef on K562 cells was calculated by regression analysis; $IC_{50} = 97.3 \mu\text{g/ml}$; $R^2 = 0.9094$. (C) *In vitro* assessment of PaDef IC_{50} by flow cytometry at 24 h. Representative plots of the different conditions are shown. Act-D (Actinomycin D, 80 µg/ml) was used as a positive control. (D) K562 cell morphology after PaDef treatment. Representative photographs taken by light field microscopy are shown. Scale bars: 10 µm. (E) Effect of PaDef on the viability of human peripheral blood mononuclear cells. Cells were treated with PaDef (100, 200 and 300 µg/ml) and viability was evaluated by MTT (24 h). Data represent the media of three independent experiments performed in triplicate. *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$).

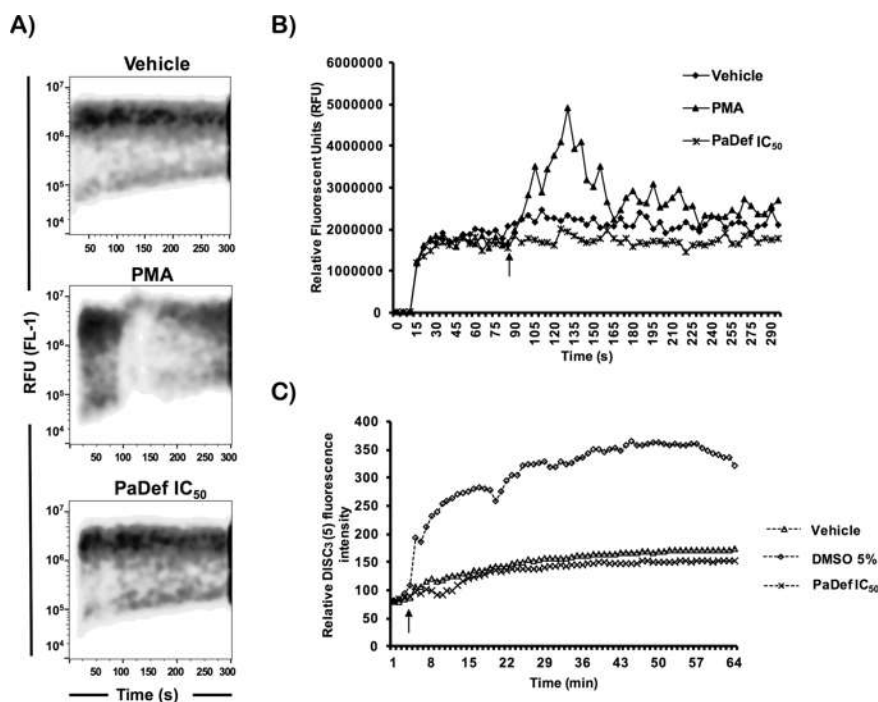


Fig. 2. PaDef defensin does not cause damage to the cell membrane of K562 cells. Calcium efflux was assessed by flow cytometer using the Calcium Assay Kit (BD Biosciences). The panel shows representative plots (A) and relative fluorescence intensities for intracellular calcium release (B). Measurements were performed for 6 min. PMA (3 μ M) was used as a positive control. (C) The modification in the membrane potential was assessed using a membrane potential-sensitive dye. Cells were previously incubated with the dye DiSC3(5) (200 μ M) for 30 min and then treated with PaDef IC₅₀. DMSO (5%) was used as a positive control. The addition of treatments is indicated by an arrow.

between healthy mitochondria (red fluorescence) from those with damage (green fluorescence).

2.8. Determination of reactive oxygen species (ROS)

ROS were measured by flow cytometry in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA) (Thermo Scientific). K562 cells were cultured in RPMI-1640 medium without serum by 12 h. Then, the medium was replaced and the cells (2×10^4 cells/well) were cultured in 96-well plates with 100 μ l of fresh medium containing PaDef IC₅₀ or vehicle and incubated by 24 h. Next, the cells were collected and incubated with H2DCFDA 25 mM for 2 h/37 °C in darkness. Ethanol 12% was used as positive control. A total of 10,000 events were analyzed.

2.9. RNA isolation and gene expression analysis

Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) from K562 cells (1×10^5 cells/well) cultured in 24-well plates and incubated with PaDef IC₅₀ or vehicle for 6, 12, and 24 h, according to the manufacturer's instructions and then used to synthesize cDNA as described (Alva-Murillo et al., 2012). The qPCR analysis was carried out by the comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The genes analyzed and oligonucleotides employed are shown in (Table 1).

β -actin was used as endogenous gene.

2.10. Quantification of TNF- α secretion

For the measurement of TNF- α we used the conditioned media from K562 cells treated with PaDef IC₅₀ or vehicle. TNF- α concentrations were determined using a Becton Dickinson cytometric bead array (CBA) in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

2.11. Statistical analysis

The data were obtained from three independent experiments performed by triplicate. The significance of the differences was assessed using Student's t-test. A p value < 0.05 was considered significant. In qPCR analysis, fold-change values > 2 or < 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs (Morey et al., 2006).

3. Results

3.1. PaDef defensin is cytotoxic to K562 cells

PaDef cytotoxicity (10–200 μ g/ml) on K562 cells was analyzed by MTT. In Fig. 1A we showed that PaDef was cytotoxic to K562 cells in a concentration-dependent manner at 24 h (Fig. 1A), showing IC₅₀ value of 97.3 μ g/ml (18.65 μ M) (Fig. 1B and C). A microscopic analysis

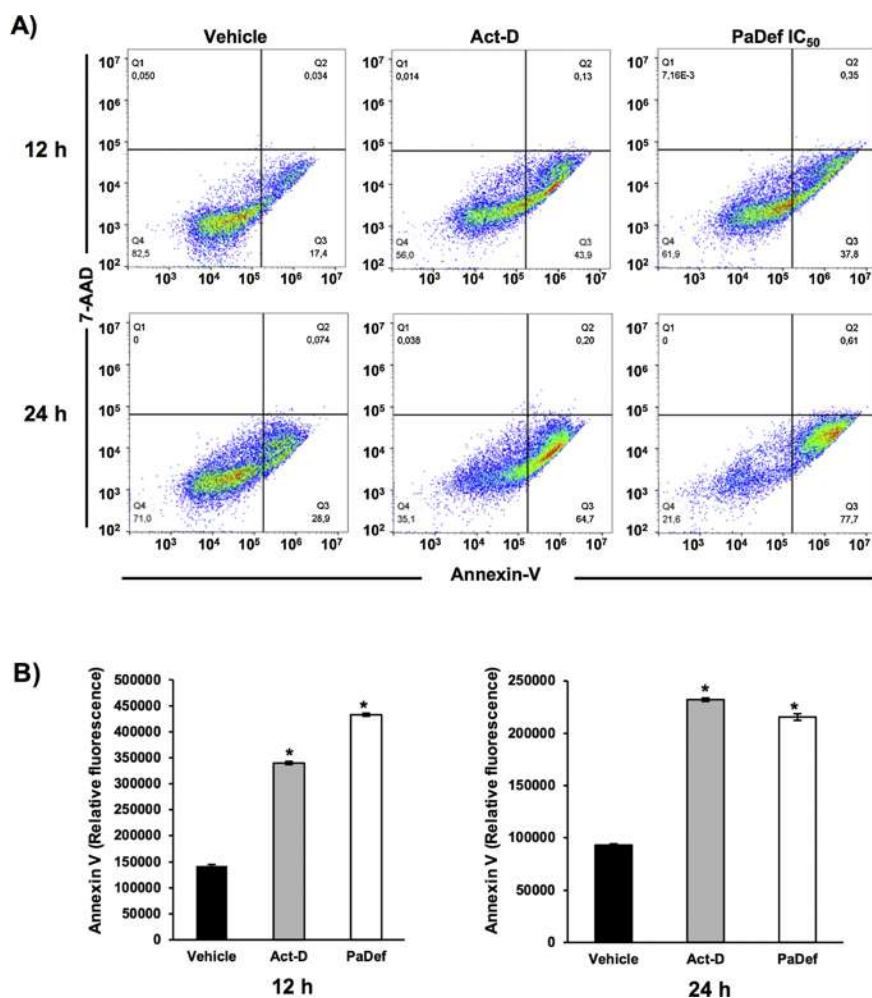


Fig. 3. PaDef defensin induces apoptosis in K562 cells. (A) Cells treated with PaDef IC_{50} (12 and 24 h) were analyzed by flow cytometry using Annexin V/7AAD staining to establish the apoptotic rate. The quadrants indicate viable cells (lower left quadrant), early apoptosis (lower right quadrant), late apoptosis (upper right quadrant) and necrotic cells (upper left quadrant). (B) The graphics show the relative fluorescence for each time of treatment (relative units). Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of three independent experiments. *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$).

indicated that K562 cells did not show morphological alterations, which suggests that PaDef does not alter the membrane of these cells (Fig. 1D). Also, PaDef did not affect human peripheral blood mononuclear cells evaluated by MTT (Fig. 1E) and flow cytometry (data not shown). For the rest of the experiments we used the IC_{50} .

3.2. PaDef defensin does not affect the cell membrane of K562 cells

To determine if cytotoxicity of PaDef defensin on K562 cells involves cell membrane damage, we evaluated the intracellular calcium efflux and membrane electrical potential. The data indicated that

cytotoxicity of PaDef was not related to the cell membrane damage due that the efflux of intracellular calcium was not affected (Fig. 2A) nor the membrane electrical potential (Fig. 2B).

3.3. PaDef defensin cytotoxicity on K562 cells involve extrinsic apoptosis

In agreement with the results, PaDef defensin cytotoxicity on K562 cells is not related to cell membrane damage. Thus, we evaluated if PaDef induces apoptosis in K562 cells. As shown in Fig. 3, PaDef induced apoptosis from 12 h (> 30%) in K562 cells, which was similar to the effect showed by actinomycin D.

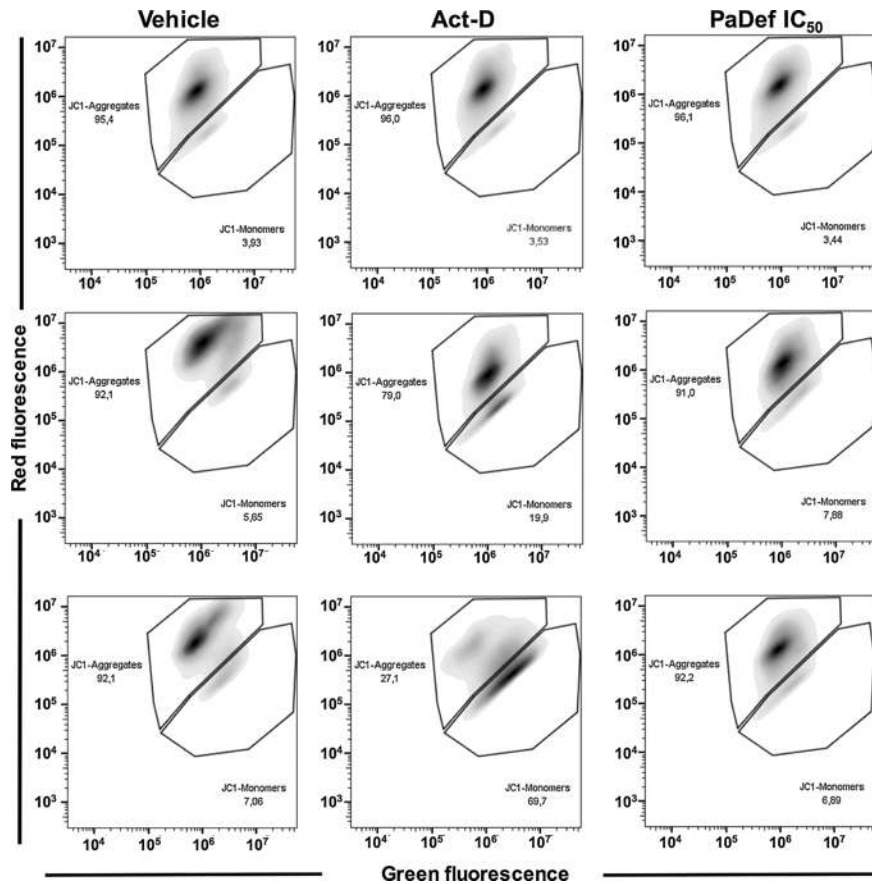


Fig. 4. PaDef defensin did not modify the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in K562 cells. Cells were analyzed by flow cytometry using the JC-1 dye after the add the treatments: vehicle (DMSO 0.39%), Act-D (Actinomycin D, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and PaDef IC₅₀ for 6, 12 and 24 h.

To determine the apoptosis pathway involved in PaDef cytotoxicity, first we evaluated the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) using the dye JC-1. K562 cells treated with PaDef IC₅₀ at 6, 12 and 24 h did not show modifications in the $\Delta\Psi_m$ (Fig. 4). On the other hand, we detected that PaDef up-regulates the gene expression of caspase 8 (~2 fold), but not the expression of caspase 9 gene (Fig. 5). Accordingly, the PaDef treatment induced the activation of caspase 8 but not caspase 9 (Fig. 5). In addition, when caspase 8 activity was blocked with the specific inhibitor Ac-IETD-CHO, the apoptosis rate of K562 cells was reduced (~30%) (Fig. 6). Also, we did not detect modifications in the ROS production in K562 cells treated with PaDef (data not shown). These results suggest that PaDef activates extrinsic apoptosis in K562 cells.

3.4. PaDef induces TNF- α and TNF receptor 1 (TNFR1) gene expression and TNF- α protein secretion

The extrinsic apoptosis may be activated by TNF α /TNFR1

interaction. For this reason, we analyzed the effects of PaDef IC₅₀ on TNF- α and TNFR1 gene expression. qPCR analysis demonstrated that PaDef treatment (24 h) significantly induced the TNF- α gene expression (~4 fold), as well as the expression of TNFR1 since 6 h (~10 fold). Additionally, PaDef treatment favors the TNF- α protein secretion at 24 h (~5 fold) (Fig. 7). These results support the fact that PaDef induces extrinsic apoptosis in K562 cells.

4. Discussion

Cytotoxicity and specificity of antimicrobial peptides have been considered as a therapeutic alternative in cancer treatment (Al-Benna et al., 2011; Pushpanathan et al., 2013; Riedl et al., 2011). Plants are an important source of antimicrobial peptides; however, most of the studies carried out with these AMP essentially describe their cytotoxic effects, but the underlying mechanisms are poorly understood (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). Additionally, these studies have been mainly focused to solid tumor cells. In this work, we showed that PaDef

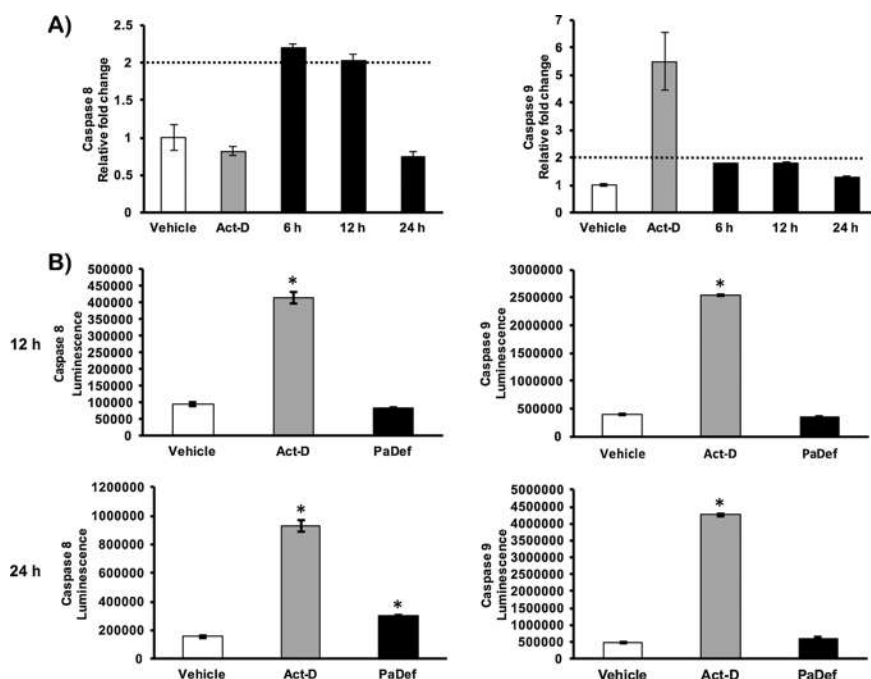


Fig. 5. PaDef defensin induces the mRNA expression and activity of caspase 8 in K562 cells. (A) mRNA expression of caspase 8 (left graph) and caspase 9 (right graph) was analyzed by RT-qPCR. Cells were treated with PaDef IC_{50} for 6, 12 and 24 h. mRNA expression of control cells (vehicle and Act-D) was analyzed at 24 h. Fold-change values > 2 or < 0.5 were considered significant expressed mRNAs. (B) Activity of caspase 8 (left graph) and caspase 9 (right graph) was measured in cells treated with PaDef IC_{50} at 12 and 24 h by luminescence. Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of three independent experiments. *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$).

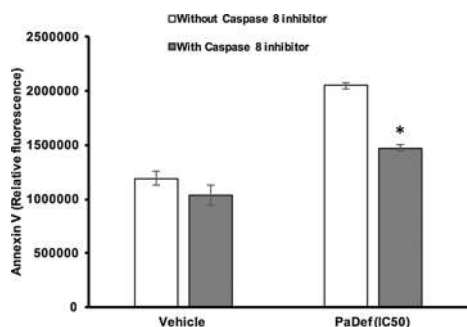


Fig. 6. Involvement of caspase 8 in the apoptosis induced by defensin PaDef in K562 cells. Cells were treated 1 h with the caspase 8 specific inhibitor Ac-IETD-CHO (100 μ M), and then the cells were treated 24 h with PaDef IC_{50} . Apoptosis was assessed by flow cytometry measuring the relative fluorescence of Annexin V. *Indicates statistically significant differences with respect to PaDef treatment ($P < 0.05$).

defensin is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis pathway, thereby expanding the activities described for this peptide.

Cytotoxicity of PaDef defensin on K562 cells was in a concentration-dependent manner with an IC_{50} of 97.3 μ g/ml (18.65 μ M) (Fig. 1).

Interestingly, the PaDef IC_{50} was lower than that reported for other plant defensins on leukemia cells such as coccin (30 μ M) (Ngai and Ng, 2004) and phaseococcin (40 μ M) from *Phaseolus coccineus* (Ngai and Ng, 2005), gymnin (50 μ M) from *Gymnocladus chinensis* (Wong and Ng, 2003), but was greater to the effect reported for NaD1 from *Nicotiana glauca* (10 μ M) (Baxter et al., 2017). In addition, in a previous study we reported that PaDef is cytotoxic to human breast cancer cell line MCF-7 at IC_{50} of 141.62 μ g/ml (27.23 μ M) (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). These results suggest that PaDef defensin is more active to leukemia cells than to cells derived from solid tumors; however, it is necessary to evaluate its effect against a wider number of cell lines from different origins. Also, PaDef lacks toxicity toward human peripheral blood mononuclear cells as reported previously (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). These results support the fact that this avocado defensin is an attractive peptide to evaluate its effects on cancer cells.

There are few studies where the cytotoxic mechanisms of plant defensins have been described in detail. Respect to plant defensins their cytotoxicity on leukemia cells involves essentially membrane damage that leads to cell lysis, as reported for plant defensins NaD1 (*N. glauca*) and TPP3 (*L. esculentum*) (Baxter et al., 2015; Poon et al. 2014). Remarkably, we demonstrated that PaDef does not affect the membrane integrity of K562 cells, because the calcium intracellular efflux and membrane potential were not modified (Fig. 2). These data suggest that cytotoxicity of plant defensin PaDef on K562 cells involves other mechanism.

The principal cytotoxic non-membranolytic mechanism described in plant defensins is apoptosis and essentially it has been evaluated in the

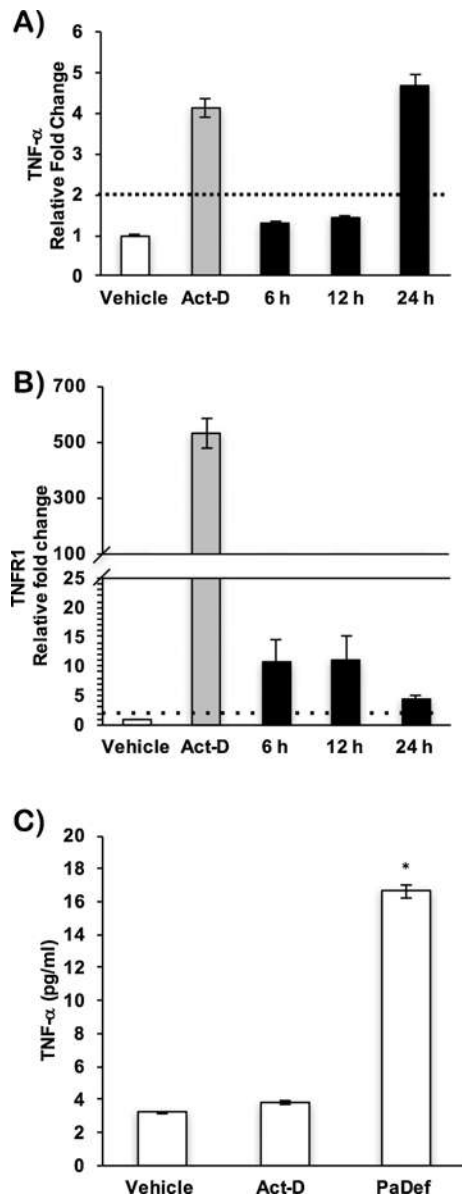


Fig. 7. PaDef induces the TNF- α and TNF receptor 1 (TNFR1) mRNA expression and the TNF- α protein secretion. Cells treated with PaDef IC_{50} for 6, 12 and 24 h were analyzed by qPCR to analyze mRNA expression of TNF- α (A) and TNFR1 (B). mRNA expression of control cells (vehicle and Act-D) were analyzed at 24 h. Fold-change values > 2 or < 0.5 were considered significant expressed mRNAs. (C) Secretion of TNF- α was analyzed using a cytometric bead array (CBA). Cells were treated with PaDef IC_{50} for 24 h. A total of 350 events were analyzed.

fungus *Candida albicans*, as reported for the radish defensin RsAFP2, which induces apoptosis by caspase activation, or HsAFP1 defensin, which induces apoptosis in this fungus through ROS production (Aerts et al., 2009; Aerts et al., 2011). Caspase-dependent apoptosis can be activated by the extrinsic pathway (mediated by transmembrane receptors) or by the intrinsic pathway (mitochondria-mediated). Previously, we demonstrated that PaDef activates the intrinsic apoptosis pathway in MCF-7 cells (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). Noteworthy, in this work we showed evidences supporting that PaDef cytotoxicity on K562 cells occurs through extrinsic apoptosis pathway due that this defensin favors the expression and activation of the typical initiator caspase 8 (Figs. 5 and 6). These data were supported by the fact that we did not detect modifications in ROS production neither in the mitochondrial membrane potential in K562 cells treated with PaDef. Besides, this peptide did not change the expression nor the activity of caspase 9 (initiating caspase of the intrinsic pathway). To our knowledge, this is the first report indicating that a plant defensin induces extrinsic apoptosis on human leukemia cells.

The apoptosis extrinsic pathway involves transmembrane receptor-mediated interactions, such as the tumor necrosis factor receptor (Locksley et al., 2001). Also, TNF- α can induce apoptosis through the activation of caspase 8 in the RIPK1- FADD- caspase- 8 complex (Tummers and Green, 2017). In this work, PaDef treatment induced the expression of both TNF- α and TNFR1 genes, which is in agreement with the activation of extrinsic apoptosis in K562 cells. Accordingly, PaDef treatment induced the TNF- α protein secretion ~ 5 fold (Fig. 7). The data from this study indicate that PaDef defensin induces cell death in K562 cells by the extrinsic apoptosis pathway, which is a novel property for this AMP.

5. Conclusions

PaDef activates apoptosis in K562 cells by extrinsic apoptosis, which could involve the participation of TNF- α . This activity suggests that this defensin could be a potential molecule in the treatment of leukemia.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

LJFA was supported by a scholarship from CONACyT. This work was supported by grants from CONACyT (CB-2013-221363 and INFR-2014-230603) and CIC14.5 to JELM; ICGBE (CRP-ICGBE/MEX13-01) to AOZ.

References

- Aerts, A.M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I.E.J.A., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2009. The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 583, 2513–2516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.004>.
- Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2011. The antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* 2, 47. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00047>.
- Al-Benna, S., Shai, Y., Jacobsen, F., Steinstraesser, L., 2011. Oncolytic activities of host defense peptides. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 8027–8051. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12118027>.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet. Microbiol.* 155, 324–331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.025>.
- Baxter, A.A., Richter, V., Lay, F.T., Poon, L.K.H., Adda, C.C., Veneer, P.K., Phan, T.K., Bleackley, M.R., Anderson, M.A., Kwansukul, M., Hulett, M.D., 2015. The tomato defensin TPP3 binds phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate via a conserved dimeric cationic grip conformation to mediate cell lysis. *Mol. Cell Biol.* 35, 1964–1978. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00282-15>.
- Baxter, A.A., Poon, L.K., Hulett, M.D., 2017. The plant defensin NaD1 induces tumor cell

- death via a non-apoptotic, membranolytic process. *Cell Death Discov.* 2017 (3), 16102. <http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.102>.
- Cederlund, A., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., 2011. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* 278, 3942–3951. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08302.x>.
- Cubillas, R., Kintner, K., Phillips, F., Karandikar, N.J., Thiele, D.L., Brown, G.R., 2010. Tumor necrosis factor receptor 1 expression is upregulated in dendritic cells in patients with chronic HCV who respond to therapy. *Hepat. Res. Treat.* 2010, 429243. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/429243>.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–386. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- Gao, S., Hsieh, C.-L., Bhansali, M., Kannan, A., Shemshedini, L., 2013. A peptide against soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$: a new approach to treating prostate cancer. *PLoS One* 8, e64189. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064189>.
- Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2016. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PdDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomed. Pharmacother.* 82, 620–627. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>.
- Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L.M., Salgado-Garciglia, R., Rodríguez-Zapata, L.C., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2013. Antibacterial activity of defensin PdDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biomed. Res. Int.* 2013, 986273. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/986273>.
- Guzmán-Rodríguez, J.J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., López-Meza, J.E., 2015. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/735087>.
- Koskimaki, J.E., Karagiannis, E.D., Rosca, E.V., Vesuna, F., Winnard, P.T., Raman, V., Bhujwala, Z.M., Popel, A.S., 2009. Peptides derived from type IV collagen, CXC chemokines, and thrombospondin-1 domain-containing proteins inhibit neovascularization and suppress tumor growth in mda-mb-231 breast cancer xenografts 1,2. *Neoplasia* 11, 1285–1291. <http://dx.doi.org/10.1593/neo.09620>.
- Kuriyama, I., Miyazaki, A., Tsuda, Y., Yoshida, H., Mizushima, Y., 2013. Inhibitory effect of novel somatostatin peptide analogues on human cancer cell growth based on the selective inhibition of DNA polymerase β . *Bioorg. Med. Chem.* 21, 403–411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.024>.
- Kuroda, K., Fukuda, T., Isogai, H., Okumura, K., Krstic-Demonacos, M., Isogai, E., 2015. Antimicrobial peptide FF/CAP18 induces apoptotic cell death in HCT116 colon cancer cells via changes in the metabolic profile. *Int. J. Oncol.* 46, 1516–1526. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2015.2887>.
- Lay, F., Anderson, M., 2005. Defensins - components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 85–101. <http://dx.doi.org/10.2174/1389203053027575>.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9).
- Mader, J.S., Salsman, J., Conrad, D.M., Hoskin, D.W., 2005. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 4, 612–624. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0077>.
- Morey, J.S., Ryan, J.C., Van Dolah, F.M., 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol. Proced. Online* 8, 175. <http://dx.doi.org/10.1251/BPO126>.
- Mookherjee, N., Brown, K.L., Bowdish, D.M.E., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp, K., Roche, F.M., Mu, R., Doho, G.H., Pistolic, J., Powers, J.-P., Bryan, J., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W., 2006. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J. Immunol.* 176, 2455–2464. <http://dx.doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.4.2455>.
- Ngai, P.H., Ng, T.B., 2004. Coccinin, an antifungal peptide with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from large scarlet runner beans. *Peptides* 25, 2063–2068. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.08.003>.
- Ngai, P.H., Ng, T.B., 2005. Phaseococcin, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans. *Biochem. Cell Biol.* 83, 212–220. <http://dx.doi.org/10.1139/o05-037>.
- Ourth, D.D., 2011. Antitumor cell activity in vitro by myristoylated-peptide. *Biomed. Pharmacother.* 65, 271–274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2011.02.015>.
- Papo, N., Seger, D., Makovitzki, A., Kalchenko, V., Eshhar, Z., Degani, H., Shai, Y., 2006. Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide. *Cancer Res.* 66, 5371–5378. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4569>.
- Pasic, I., Lipton, J.H., 2017. Current approach to the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Res.* 55, 65–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2017.01.005>.
- Peters, B.M., Shirriff, M.E., Jabra-Rizk, M.A., 2010. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 6, e1001067. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>.
- Poon, I.K., Baxter, A.A., Lay, F.T., Mills, G.D., Adda, C.G., Payne, J.A., Phan, T.K., Ryan, G.F., White, J.A., Vener, P.K., van der Weerden, N.L., Anderson, M.A., Kvanakul, M., Hullett, M.D., 2014. Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *Elife* 3, e01808. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.01808>.
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., Rajendran, J., 2013. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *Int. J. Pept.* 2013, 675391. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/675391>.
- Ren, S.X., Shen, J., Cheng, A.S.L., Lu, L., Chan, R.L.Y., Li, Z.J., Wang, X.J., Wong, C.C.M., Zhang, L., Ng, S.S.M., Chan, F.L., Chan, F.K.L., Yu, J., Sung, J.J.Y., Wu, W.K.K., Cho, C.H., 2013. FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells. *PLoS One* 8, e63641. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063641>.
- Riedl, S., Zwegitck, D., Lohner, K., 2011. Membrane-active host defense peptides - challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem. Phys. Lipids* 164, 766–781. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.09.004>.
- Risso, A., Braidot, E., Sordano, M.C., Vianello, A., Macri, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., Genaro, R., Bernardi, P., 2002. BMAP-28, an antimicrobial peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1926–1935.
- Thomma, B., Cammue, B., Thevissen, K., 2002. Plant defensins. *Planta* 216, 193–202. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>.
- Tummers, B., Green, D.R., 2017. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol. Rev.* 277, 76–789. <http://dx.doi.org/10.1111/immr.12541>.
- van Zogel, H., Carpentier, G., Dos Santos, C., Hamma-Kourbali, Y., Courty, J., Amiche, M., Delbé, J., 2012. Antitumor and angiostatic activities of the antimicrobial peptide dermasceptin B2. *PLoS One* 7, e44351. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044351>.
- Wong, J.H., Ng, T.B., 2003. Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill.). *Peptides* 24, 963–968. [http://dx.doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00192-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00192-X).
- Zhang, W., Li, J., Liu, L.-W., Wang, K.-R., Song, J.-J., Yan, J.-X., Li, Z.-Y., Zhang, B.-Z., Wang, R., 2010. A novel analog of antimicrobial peptide polybia-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice. *Peptides* 31, 1832–1838. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.019>.

9.2. CAPÍTULO II.

A novel cell death mechanism for the antimicrobial peptide γ -thionin from habanero chile (*Capsicum chinense*) on human K562 chronic myeloid leukemia cells

Luis José Flores-Alvarez, Alejandra Ochoa-Zarzosa and Joel E. López-Meza*

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Posta Veterinaria. C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

***Corresponding author. Tel/Fax:** (52)-443-295-8029.

E-mail address: elmeza@umich.mx (J.E. López-Meza)

Correspondence address: Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carr, Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México. **E-mail address:** elmeza@umich.mx

ABSTRACT

The defensins are a group of antimicrobial peptides with activity against cancer cells. However, the mechanism of action for these peptides has been described mainly for animal defensins. In this study, we showed that defensin γ -thionin (*Capsicum chinense*) was cytotoxic on K562 leukemia cell line with an IC_{50} 290 $\mu\text{g/ml}$ (50.26 μM), but not for human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The mechanism by which γ -thionin acts on K562 cells was caspase-independent apoptosis. γ -thionin did not affect the membrane potential. However, the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and the intracellular calcium release were modified at short times of treatment with the peptide. The activation of caspases 8 and 9 was not detected. Interestingly, the activation of calpains was detected at 1 h, suggesting that the caspase-independent apoptosis but dependent of calpains was activated. This is the first report of a plant defensin that activates caspase-independent apoptosis via calpains in K562 cells, which is a novel property for this plant defensin.

Keywords:

Leukemia; calpains; apoptosis; antimicrobial peptides; γ -thionin.

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMP's) are small peptides (12-100 aa) mainly amphipathic and cationic, produced by a wide gamma of organisms¹. They are recognized mainly for their antimicrobial properties, but also have other functions such as immunomodulation, repair, induction of angiogenesis and cytotoxicity^{2, 3}. More than 3000 AMP's have been described and ~7% have anticancer activity with high efficacy and selectivity⁴; however, the cytotoxic mechanisms have not been described in detail^{5, 6, 7}.

AMP's from plants (PAP) represent ~3% of the genes described in plants and have an average size of 40-50 aa, with a weight of 3-10 kDa, they are rich in cysteine residues, and can be expressed constitutively or by damage^{8, 9, 10, 11}. PAP have been grouped into 12 families, but only three of them (thionins, defensins and cyclotides) shown cytotoxic activity^{11, 12, 13}.

The plant defensins (PDs) comprise a group of PAP whose structure is composed of helix- α and β -sheet, which resemble the animals and insects defensins^{9, 14}. The PDs have been isolated from seeds, leaves, tubers, fruits, roots and barks¹⁵. They have antibacterial, antifungal and insecticide activities, besides influencing the plant growth and development^{16, 17}. The anticancer potential of DP's lies in their selectivity against cancer cells of different origins (breast, colon, prostate, leukemia)¹⁸. However, there are few studies about the mechanism of cytotoxicity of these PDs.

Recently, the cytotoxic mechanism of the defensins NaD1 (*Nicotiana glauca*) and TPP3 (tomato) have been described, which involves the peptide binding to the cell membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate causing cell lysis on Jurkat and U937 cells. Also, the cytotoxic mechanisms of PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) on K562 chronic myeloid cells and MCF-7 were reported, which involve extrinsic and intrinsic apoptosis, respectively^{19, 20, 21, 22}.

Apoptosis is defined as the set of biochemical reactions that take place in the cell and determine its death in a regulated manner in response to a series of physiological or pathological events^{29, 30}. Apoptosis can be mediated by extrinsic stimuli through death surface receptors, such as TNF- α (tumor necrosis factor- α), Fas (CD95 / APO1) and TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) or by intrinsic stimulation mediated by mitochondria^{31, 32, 33, 34}.

The pathway associated with death receptors is activated by the interaction of its ligand (Fas-Fas-L, TNF- α -R1, R2), which causes the activation of caspase-8 allowing to executor caspases (caspases 3, 6, 7) act on different elements involved in the cellular and nuclear structure³⁵. The intrinsic (mitochondrial) apoptosis is triggered by any stimulus (physical-chemical), which affects the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), likewise this is regulated by proteins of the Bcl-2 family^{36, 37}. These modifications cause the release to the cytoplasm of different molecules (cytochrome c, calcium, inducer factor of apoptosis, endonucleases G, ROS), which leads to the formation of the apoptosome to act on caspase 9, and subsequently to executor caspases^{36, 38, 39}. However, also apoptosis can be activated by independent caspase pathway, which could involve calpains. Calpains are a type of cysteine-proteases that can be found in the cytoplasm and mitochondria, which require calcium for their activation, and trigger apoptosis due to their interaction with pro-apoptotic proteins such as Bax; they induce apoptosis independent of caspases mediated by AIF (Apoptosis Induction Factor)^{33, 40, 41, 42}.

The γ -thionin defensin of *Capsicum chinense* has antimicrobial and cytotoxic activity against *Candida albicans* and HeLa cells, respectively⁴⁵. However, the mechanism of action involved has not been described in detail. In this work we demonstrated that γ -thionin was cytotoxic towards K562 but did not affect peripheral blood mononuclear cells (PBMC). In addition, we elucidated the mechanism of action, which occurs through apoptosis independent of caspases mediated by calpains, a pathway not described for this type of antimicrobial peptides until now.

2. Results

2.1 γ -thionin defensin is cytotoxic to K562 cells

To investigate whether γ -thionin defensin could be a cytotoxic compound, we evaluated its activity on K562 leukemia cells, as well as its selectivity using PBMC by MTT assay. γ -thionin defensin was incubated with K562 cells using different concentrations (10-300 $\mu\text{g/ml}$) and viability was evaluated at 24 h. γ -thionin was cytotoxic to K562 cells in a concentration-dependent manner (Fig. 1A), with an IC_{50} of 290 $\mu\text{g/ml}$ (50.26 μM) (Fig. 1B and C). Morphological

evaluation indicates that K562 cells showed alterations similar to apoptotic vesicles (Fig. 1D). Also, by MTT assay (Fig. 1E) and flow cytometry (data not shown) we showed that γ -thionin defensin did not affect PBMC viability at 12 and 24 h.

2.2 γ -thionin defensin does not affect the integrity membrane cell K562 cells

One of the mechanisms for antimicrobial peptide actions is the destabilization of the cell membrane by pore formation⁴⁸. To determine if cytotoxicity of γ -thionin defensin on K562 cells is related to cell membrane damage we evaluated the plasma membrane potential using 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, DiSC3 (5). According to results, γ -thionin defensin did not affect plasma membrane electrical potential compared with the positive control (DMSO 5%) (Fig. 2).

2.3 γ -thionin defensin induces apoptosis without activation of caspases in K562 cells

One discarded the membranolytic mechanism, we analyzed the activation of non-membranolytic mechanism. Different reports for antimicrobial peptides have described apoptosis as the main mechanism of cell death (e.g., Pep2, Pep3, bovine lactoferricin, PaDef)^{21, 49}. The induction of apoptosis was evaluated at 12 and 24 h. γ -thionin defensin induced apoptosis since 12 h (> 30%), which increased at 24 h (> 45%) in K562 cells (Fig. 4), this effect was similar to that showed by actinomycin D (Fig. 3). To identify the specific pathway activated, we evaluated the activation of caspases 8 and 9 by luminescence. We did not detect activation of both caspases at 12 and 24 h (Fig. 4).

Interestingly, γ -thionin modified the mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi_m$ since 6 h (Fig. 5) and the intracellular calcium efflux (Fig. 6), which suggest an alternative mechanism not described for plant antimicrobial peptides as the caspase-independent apoptosis mediated by calpains. Further, the calpains activity was measured by a luminescence assay. Measurements were evaluated at 1, 2, 4, 12 and 24 h. Results showed that γ -thionin cytotoxicity on K562 cells is related to caspase-independent apoptosis mediated by calpains because this defensin promotes the activation of calpains (Fig. 7). In support,

when the calpains activity was blocked with the specific inhibitor N-Acetyl-Leu-Leu-normoleucinal the rate of apoptosis induced by γ -thionin in K562 cells decreased (~19%) (Fig. 8).

3. Discussion

In the development of alternative therapies against cancer, plant antimicrobial peptides have attracted attention for their cytotoxicity, efficacy and selectivity against some types of cancer^{11, 12, 13, 18, 27}. Hence, we showed that the plant defensin γ -thionin (*Capsicum chinense*) is cytotoxic against the K562 leukemia cells and that its mechanism of action is by caspase-independent apoptosis mediated by calpains.

γ -thionin was cytotoxic to K562 cells in a concentration-dependent manner, with an IC₅₀ of 290 μ g/ml (50.26 μ M) (Fig. 1). Interestingly, the γ -thionin IC₅₀ was greater with respect to the effect of other plant defensins on leukemia cells such as NAD1 (2.4 μ M), coccinin (30 μ M), phaseococcin (40 μ M) and gymnin (50 μ M)^{21, 32, 50, 51, 52}. In our work group we reported that defensin γ -thionin is cytotoxic toward human breast cancer cells MCF-7 IC₅₀ 117.29 μ g/ml (20.33 μ M) (data not reported). In addition, γ -thionin defensin was not cytotoxic against human peripheral blood mononuclear cells, as previously reported²¹, suggesting that it could be selective against cancer cells; however, more experiments are needed to prove it.

The main mechanism of cytotoxicity reported for plant defensins on leukemia cells involves damage to the membrane, reported for the plant defensin NaD1 (*N. alata*) and TPP3 (*L. esculentum*)^{19, 20}. The defensin γ -thionin did not affect the membrane integrity of K562 cells (Fig. 2); however, the morphology was affected showing structures like-apoptotic bodies (Fig. 1D). These results suggest that the cytotoxicity of γ -thionin on K562 cells involves a different mechanism.

Apoptosis is a process of ordered cell death which occurs through two principle mechanisms, the intrinsic and extrinsic pathway, each with unique characteristics of induction and execution. Apoptosis is a mechanism of cytotoxicity poorly described for plant defensins. The induction of apoptosis has only been reported in the radish defensins RsAFP2 and coral bells HsAFP1

using the fungus model *Candida albicans*^{53, 54}. Recently we demonstrated that PaDef defensin activates apoptosis in MCF-7 and K562 cells by intrinsic and extrinsic pathways, respectively^{21, 22}. In this work we show evidence that γ -thionin cytotoxicity on K562 cells occurs through apoptosis independent of caspases. γ -thionin defensin induces apoptosis at 12 h (Fig. 3); however, activity of caspases 8 and 9 was not detected (Fig. 4). Interestingly, the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and the intracellular calcium release of K562 cells were modified by defensin at short times (Fig. 5 and 6), both phenomena are characteristic of caspase-independent apoptosis mediated by calpains^{33, 40, 41, 42}. The activity of calpains was detected after 1 h of treatment (Fig. 7). Only the human cathelicidin LL-37 has been reported with the ability to activate this calpain-dependent mechanism³³. To our knowledge, this is the first report for a plant defensin inducing caspase-independent apoptosis mediated by calpains in leukemia cells.

4. Material and Methods

4.1 Drug treatment

The antimicrobial peptide γ -thionin used in this work corresponds to the mature region

(QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC, 50 aa) (Genbank KC007441)⁴, which was chemically synthesized and obtained from BIOMATIK.

4.2 Mammalian cell culture

The human leukemia cell line K562 was obtained from American Type Culture Collection. Cells were routinely cultured in RPMI-1640 Media (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Corning) and 100 U/ml of penicillin and streptomycin (Gibco) and grown in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained from blood from healthy men volunteers. The PBMC were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque™ Plus (GE healthcare), and the cells were kept under the same conditions mentioned above.

4.3 Cell viability assays

The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] assay was used to assess the cytotoxicity of γ -thionin. Briefly, K562 cells were synchronized in RPMI-1640 medium without serum (12 h). Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 2×10^4 cells/well and cultured with γ -thionin peptide at various concentrations as indicated (10, 25, 50, 100, 200 and 300 $\mu\text{g/ml}$). After 24 h of incubation, 10 μl of MTT solution (5 mg/ml, Sigma - Aldrich) was added to each well and plates were incubated at 37 °C, in 5% CO_2 for 4 h. Then 100 μl of isopropyl alcohol: HCl (19:1) was added to dissolve formazan crystals and was incubated by 20 min. Absorbance was measured at 595 nm using a microplate reader (iMark Microplate Absorbance Reader, BioRad). Actinomycin D was used as cell death positive control. The results were reported as percentage of viability with respect to vehicle (DMSO 1.2%). Using Excel (Microsoft) the half maximal inhibitory concentration ($\text{IC}_{50} = 290 \mu\text{g/ml}$) was determinate by regression analysis. Additionally, SYTO[®] 9 green-fluorescent nucleic acid stain and propidium iodide was used to validate IC_{50} by flow cytometry, according to the manufacturer's instructions. The cells line K562 were prepared as previously described and treated for 24 h with IC_{50} . The measurement was carried out using a BD Accuri[™] C6 flow cytometer (BD Biosciences). For the rest of the experiments, IC_{50} concentration of γ -thionin was used.

4.4 Measurement of the transmembrane potential

The cell transmembrane potential depolarization was measured using the membrane potential sensitive dye 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, DiSC3 (5) (Sigma-Aldrich). For this, K562 cells were cultured in RPMI-1640 Media (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Corning) and 100 U/ml penicillin and streptomycin (Gibco). Cells were grown in an atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C for 24 h. Then, K562 cells (1×10^5 cells/ well) seeded in 96-well black-wall plates were incubated with 0.2 mM DiSC3 (5) (dissolved in Hanks' HEPES buffer) for 30 min in a CO_2 incubator. The fluorescence intensity was monitored for 2 h in a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific). DMSO 5% (Sigma-Aldrich) was used as a positive control.

4.5 Apoptosis and caspases activation

The apoptosis rate was carried out using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) employing Annexin V (Annexin V, Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen) and 7AAD (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. A total of 10,000 events were recorded. The data were analyzed with the FlowJo software version 10.4 (TreeStar, Inc.). Actinomycin D (Sigma-Aldrich, 80 µg/ml) was used as a positive control. The activation of caspases 8 and 9 was measured with Caspase-Glo 8 and 9 kit (Promega) according to manufacturer instructions. K562 cells (6×10^4 / well) were seeded in white 96-well plates and incubated with IC₅₀ or vehicle in serum-free medium by 12 or 24 h. The luminescence was detected using a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific). Actinomycin D (Sigma-Aldrich, 80 µg/ml) was used as a positive control.

4.6 Evaluation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

The changes of mitochondrial membrane potential were monitored using the JC-1 dye (BD Biosciences) in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The K562 cells (1×10^5 cells/well) were cultured in 96-well plates and treated with γ -thionin IC₅₀ or vehicle for 6, 12 and 24 h. The cells were treated according to the manufacturer's instructions. The fluorescence was measured in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The data were analyzed with the FlowJo software version 10.4 (TreeStar, Inc.). Actinomycin D (Sigma-Aldrich, 80 µg/ml) was used as a positive control.

4.7 Calcium efflux testing

Calcium efflux was measured by flow cytometry in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) using a Calcium Assay Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The K562 cells (1×10^5 cells/ well) seeded in 96-well plates were incubated with the indicator dye for 1 h. It was established a baseline fluorescence (3 min), and then, treatments were added (γ -thionin IC₅₀ or vehicle). The fluorescence intensity was monitored by flow cytometry without interruption for other 3 min. The data were analyzed with Excel (Microsoft). The Phorbol myristate acetate (3 µM; PMA, Sigma-Aldrich) was used as a positive control.

4.8 Activation of calpains

The activation of calpains were measured with Calpain-Glo kit (Promega) according to manufacturer instructions. For this, K562 cells (6×10^4 /well) seeded in white 96-well plates were incubated with IC₅₀ or vehicle in serum-free medium for 1, 2, 4, 12 and 24 h. The luminescence was measured in a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific). Additionally, K562 cells were incubated with the calpains inhibitor N-Acetyl-Leu-Leu-normoleucinal (5 mg/ml) for 1 h and then treated with γ -thionin IC₅₀ by 24 h and apoptosis rate was determined as described above. The cisplatin (1 μ g/ml, Pisa) was used as a positive control.

4.9 Statistical analysis

The data were obtained from three independent experiments performed by triplicate. The significance of the differences was assessed using Student's t-test. A *p* value < 0.05 was considered significant.

5. Bibliography

1. Peters, B. M., Shirliff, M. E. & Jabra-Rizk, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* **6**, e1001067 (2010).
2. Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Terán, L. M. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* **135**, 1–11 (2010).
3. Cederlund, A., Gudmundsson, G. H. & Agerberth, B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* **278**, 3942–3951 (2011).
4. Wang, G., Li, X. & Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* **37**, D933-7 (2009).
5. Gaspar, D., Veiga, A. S. & Castanho, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front. Microbiol.* **4**, 294 (2013).
6. Schweizer, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur. J. Pharmacol.* **625**, 190–194 (2009).
7. Hoskin, D. W. & Ramamoorthy, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 357–375 (2008).
8. Silverstein, K. A.T., Moskal, W. A., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D. & VandenBosch, K. A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* **51**, 262–280 (2007).
9. Thomma, B., Cammue, B. & Thevissen, K. Plant defensins. *Planta* **216**, 193–202 (2002).

10. Lay, F. & Anderson, M. Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 85–101 (2005).
11. García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., & Poza-Carrión C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defence. *FEBS Lett.* **498**, 219–222 (2001).
12. Marcus, J. P., Goulter, K. C., Green, J. L., Harrison, S. J. & Manners, J. M. Purification, Characterization and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia Integrifolia*. *Eur. J. Biochem.* **244**, 743–749 (1997).
13. de Souza Cândido, E., Pinto, M. F. S., Pelegrini, P. B., Lima, T. B., Silva, O. N., Pogue, R., Grossi-de-Sá, M. F & Franco, O. L. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J.* **25**, 3290–3305 (2011).
14. Hancock, R. E. & Chapple, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317–23 (1999).
15. García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M. & Rodríguez-Palenzuela, P. Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**, 479–491 (1998).
16. Pelegrini, P. B. & Franco, O. L. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2239–2253 (2005).
17. Allen, A. A., Snyder A.K., Preuss, M., Nielsen, E.E., Shah, D. M, & Smith, T.J. Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. *Planta* **227**, 331–339 (2007).
18. Guzmán-Rodríguez, J. J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R. & López-Meza, J. E. Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–11 (2015).
19. Poon, I. Kh., Baxter, A. A., Lay, F. T., Mills, G. D., Adda, C. G., Payne, J. A., Phan, T. K., Ryan, G. F., White, J. A., Veneer, P. K., van der Weerden, N. L., Anderson, M.A., Kvensakul, M & Hulett M. Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *Elife* **3**, e01808 (2014).
20. Baxter, A.A., Richter, V., Lay, F.T., Poon, I.K., Adda, C.G., Veneer, P.K., Phan, T.K., Bleackley, M.R., Anderson, M.A., Kvensakul, M & Hulett, M.D.. The tomato defensin TPP3 binds phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate via a conserved dimeric cationic grip conformation to mediate cell lysis. *Mol. Cell Biol.* **35**, 1964–78 (2015).
21. Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A. & López-Meza, J. E. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomed. Pharmacother.* **82**, 620–627 (2016).
22. Flores-Alvarez, L.J., Guzmán-Rodríguez, J.J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A, & López-Meza, J.E. PaDef defensin from avocado (*Persea americana* Var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *The International J. of Biochemistry & Cell Biology* **99**, 10–18. (2018).
23. Thundimadathil, J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J. Amino Acids* **2012**, 967347 (2012).
24. Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K & Zwegtlick, D. In search of a novel target — Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 2638–2645 (2011).

25. Harris, F., Dennison, S. R., Singh, J. & Phoenix, D. A. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. *Med. Res. Rev.* **33**, 190–234 (2013).
26. Perez-Tomas, R. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1859–1876 (2006).
27. Pushpanathan, M., Gunasekaran, P. & Rajendhran, J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *Int. J. Pept.* **2013**, 675391 (2013).
28. Degtarev, A & Yuan, J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews Molecular* **9**, 378-390 (2008).
29. Vaux, D. L., Weissman, I. L. & Kim, S. K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* **258**, 1955–7 (1992).
30. Hengartner, M. O. & Horvitz, H. R. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76**, 665–676 (1994).
31. Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* **17**, 2481–95 (2003).
32. Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163 (2007).
33. Green, D. R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell* **121**, 671–674 (2005).
34. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 3448–3459 (2013).
35. Mader, J. S., Mookherjee, N., Hancock, R. E. W. & Bleackley, R. C. The human host defense peptide LL-37 induces apoptosis in a calpain- and apoptosis-inducing factor-dependent manner involving Bax activity. *Mol. Cancer Res.* **7**, 689–702 (2009).
36. Bras, M., Queenan, B. & Susin, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry. (Mosc).* **70**, 231–9 (2005).
37. Kroemer, G. & Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513–519 (2000).
38. Konopleva, M., Zhao, S., Xie, Z, Segall, H., Younes, A., Claxton, D.F., Estrov, Z., Kornblau, S.M & Andreeff, M. Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **457**, 217–36 (1999).
39. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 405–413 (2007).
40. Perrin, B. J. & Huttenlocher, A. Calpain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 722–725 (2002).
41. Rizzuto, R., Simpson, A. W. M., Brini, M. & Pozzan, T. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* **358**, 325–327 (1992).
42. Sareen, D., Darjatmoko, S. R., Albert, D. M. & Polans, A. S. Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer. *Mol. Pharmacol.* **72**, 1466–75 (2007).
43. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799 (2004).
44. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
45. Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E., Baizabal-Aguirre, V. M., Cano-Camacho, H. & Ochoa-Zarzosa, A. Fungicidal and Cytotoxic Activity of a

- Capsicum chinense* Defensin Expressed by Endothelial Cells. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1101–1108 (2006).
46. Lin, P., Wong, J. H. & Ng, T. B. A defensin with highly potent antipathogenic activities from the seeds of purple pole bean. *Biosci. Rep.* **30**, 101–9 (2009).
 47. Ngai, P. H. K. & Ng, T. B. Coccinin, an antifungal peptide with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from large scarlet runner beans. *Peptides* **25**, 2063–2068 (2004).
 48. Al-Benna, S., Shai, Y., Jacobsen, F. & Steinstraesser, L. Oncolytic activities of host defense peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 8027–51 (2011).
 49. Edison, N., Reingewertz, T.H., Gottfried, Y., Lev, T., Zuri, D., Maniv, I., Carp, M.J., Shalev, G., Friedler, A & Larisch, S. Peptides Mimicking the Unique ARTS-XIAP Binding Site Promote Apoptotic Cell Death in Cultured Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2569–2578 (2012).
 50. Baxter, A. A., Poon, I. K. & Hulett, M. D. The plant defensin NaD1 induces tumor cell death via a non-apoptotic, membranolytic process. *Cell death Discov.* **3**, 16102 (2017).
 51. Ngai, P. H. & Ng, T. B. Phaseococcin, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans. *Biochem. Cell Biol.* **83**, 212–220 (2005).
 52. Wong, J. H. & Ng, T. B. Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill). *Peptides* **24**, 963–8 (2003).
 53. Aerts, A.M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I.E., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B.P & Thevissen K. The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* **583**, 2513–2516 (2009).
 54. Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P & Thevissenm, K. The antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* **2**, 47 (2011).

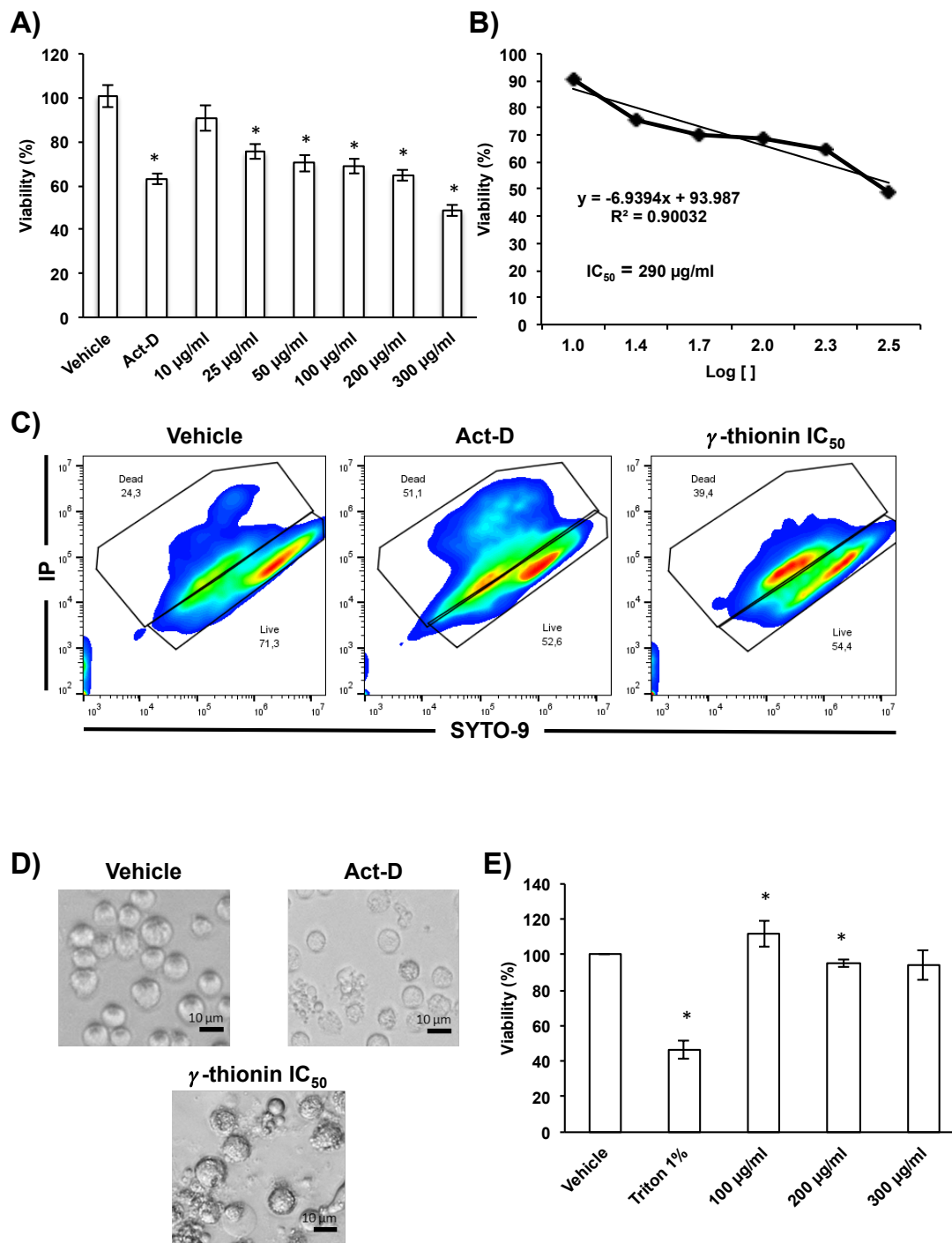


Figure 1. γ -thionin defensin is cytotoxic to K562 leukemia cells. Effect of γ -thionin on K562 cells. **(A)** Cells were treated with γ -thionin defensin (10, 25, 50, 100, 200 and 300 $\mu\text{g/ml}$), and viability was evaluated by MTT assay at 24 h. Cell viability is shown as the percentage of viable cells with respect to cells treated with vehicle (DMSO 1.2%). *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$). **(B)** The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of γ -thionin on K562 cells was calculated by regression analysis; $IC_{50} =$

290 µg/ml; $R^2 = 0.9003$. **(C)** Analysis of γ -thionin on K562 cells by flow cytometry at 24 h. The panel shows representative plots of the different conditions. Act-D (Actinomycin D, 80 µg/ml) was used as a positive control. **(D)** K562 cells morphology after different treatments. Representative photographs taken by light field microscopy are shown. Scale bars: 10 µm. **(E)** Effect of γ -thionin on the viability of human peripheral blood mononuclear cells. Cells were treated with γ -thionin (100, 200 and 300 µg/ml), and viability was evaluated by MTT assays at 24 h. Data represent the media of three independent experiments performed in triplicate. *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$).

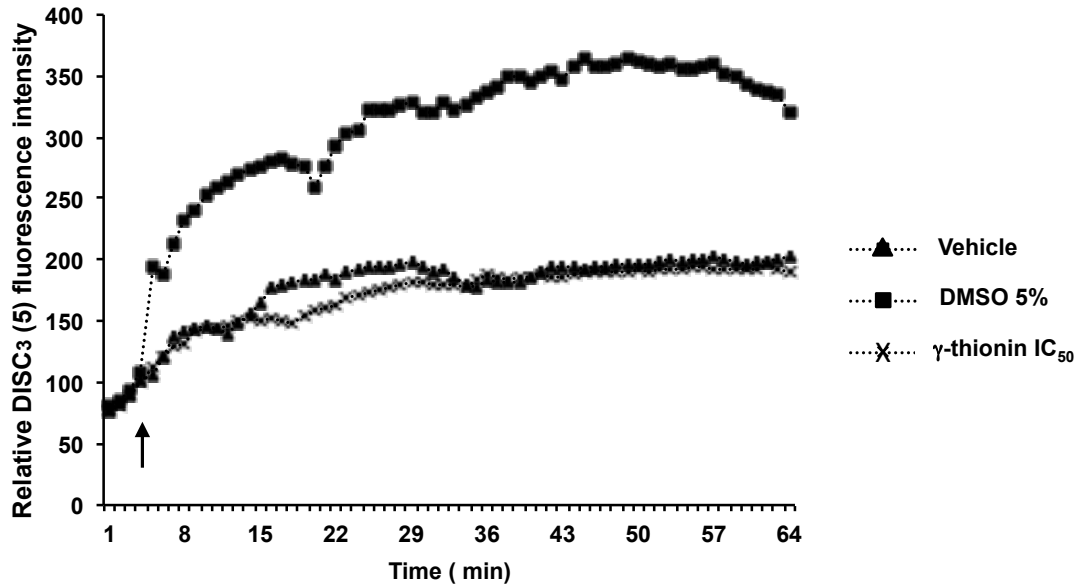


Figure 2. γ -thionin defensin does not damage the cell membrane of K562 cells. Changes in the membrane potential of K562 cells were measured using a membrane potential-sensitive dye. Cells were incubated with 200 μ M DiSC3 (5) for 30 min at 37 °C and then were treated with γ -thionin IC₅₀. DMSO (5%) was used as a positive control. Arrow indicates the time at which the treatments were added.

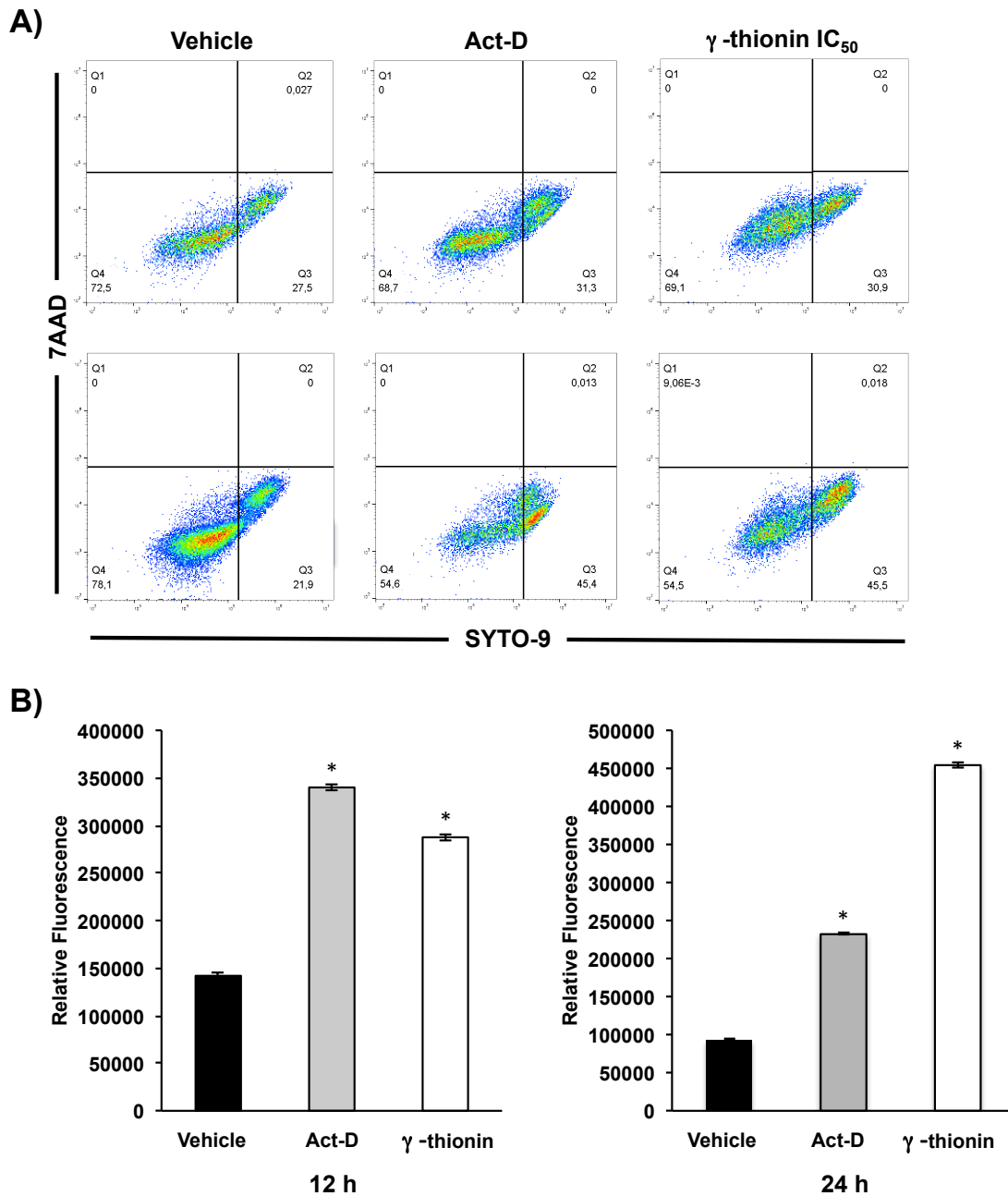


Figure 3. γ -thionin defensin induces apoptosis in K562 line cells. (A) Cells were treated with γ -thionin IC₅₀ (12 and 24 h) and analyzed by flow cytometry using Annexin V/7AAD staining. Q4 quadrant indicates viable cells, Q3 quadrant represents early apoptosis, Q2 quadrant represents late apoptosis, and the Q1 quadrant contains necrotic cells. **(B)** The graphics show the relative fluorescence for each time of treatment (relative units). *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$).

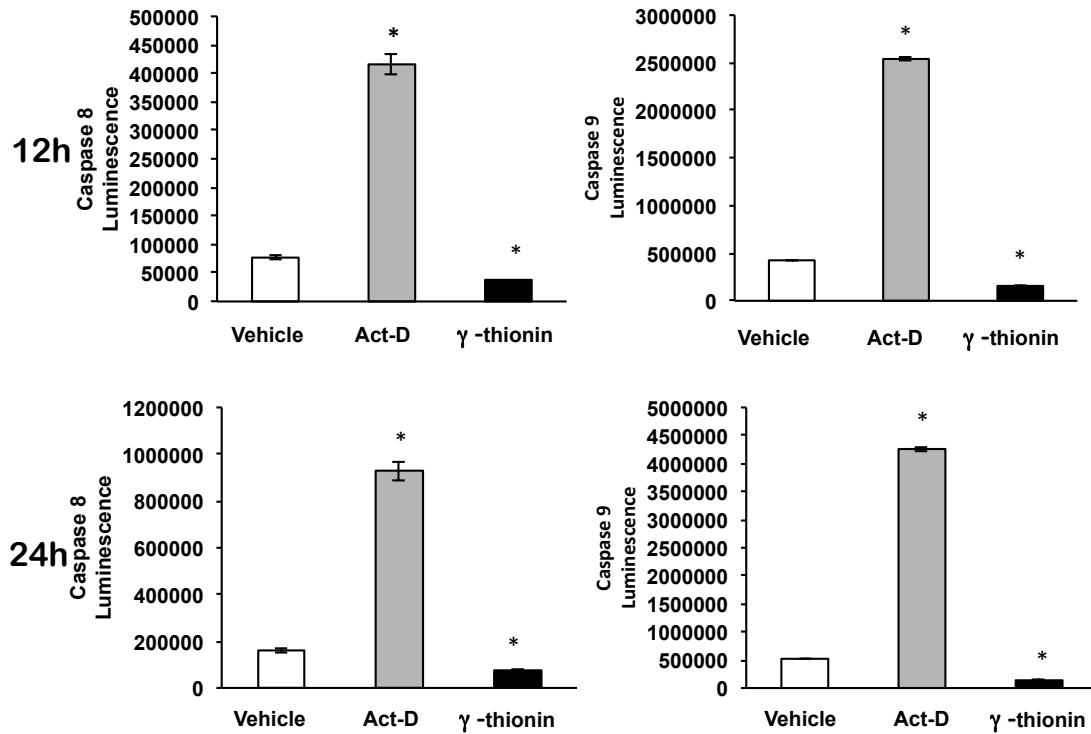


Figure 4. γ -thionin defensin does not induce activity of caspases 8 and 9. The activation of caspase 8 (Left graph) and caspase 9 (Right graph) was measured in cells treated IC_{50} γ -thionin or vehicle (12 and 24 h) by luminescence. Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of three independent experiments. *Indicates statistically significant differences with respect to vehicle ($P < 0.05$).

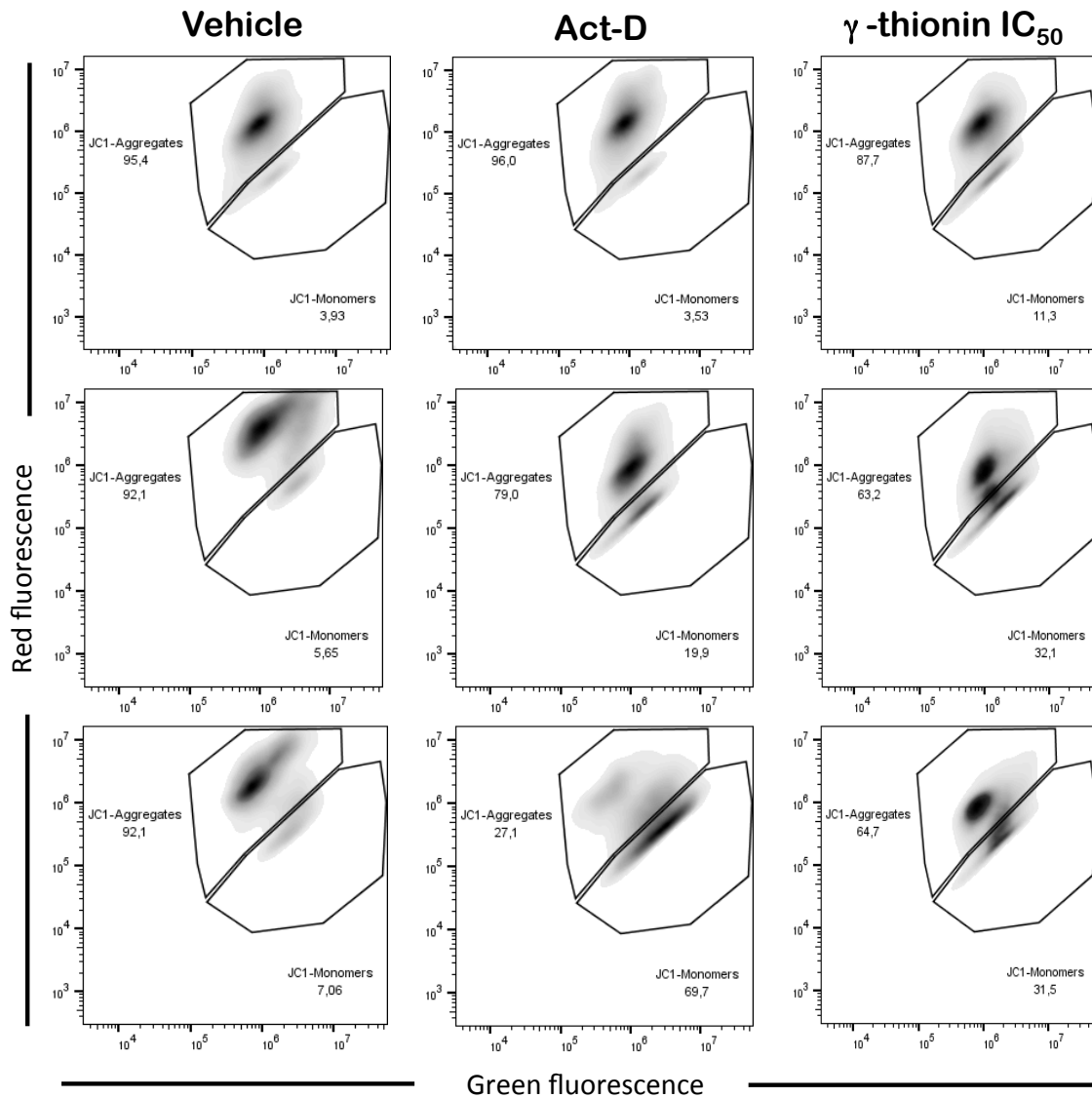


Figure 5. γ -thionin defensin modifies the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in K562 line cells. K562 cells were analyzed by flow cytometry stained with JC-1 dye after adding the treatments: Vehicle (DMSO 1.16%), Act-D, and γ -thionin IC₅₀ (6, 12 and 24 h).

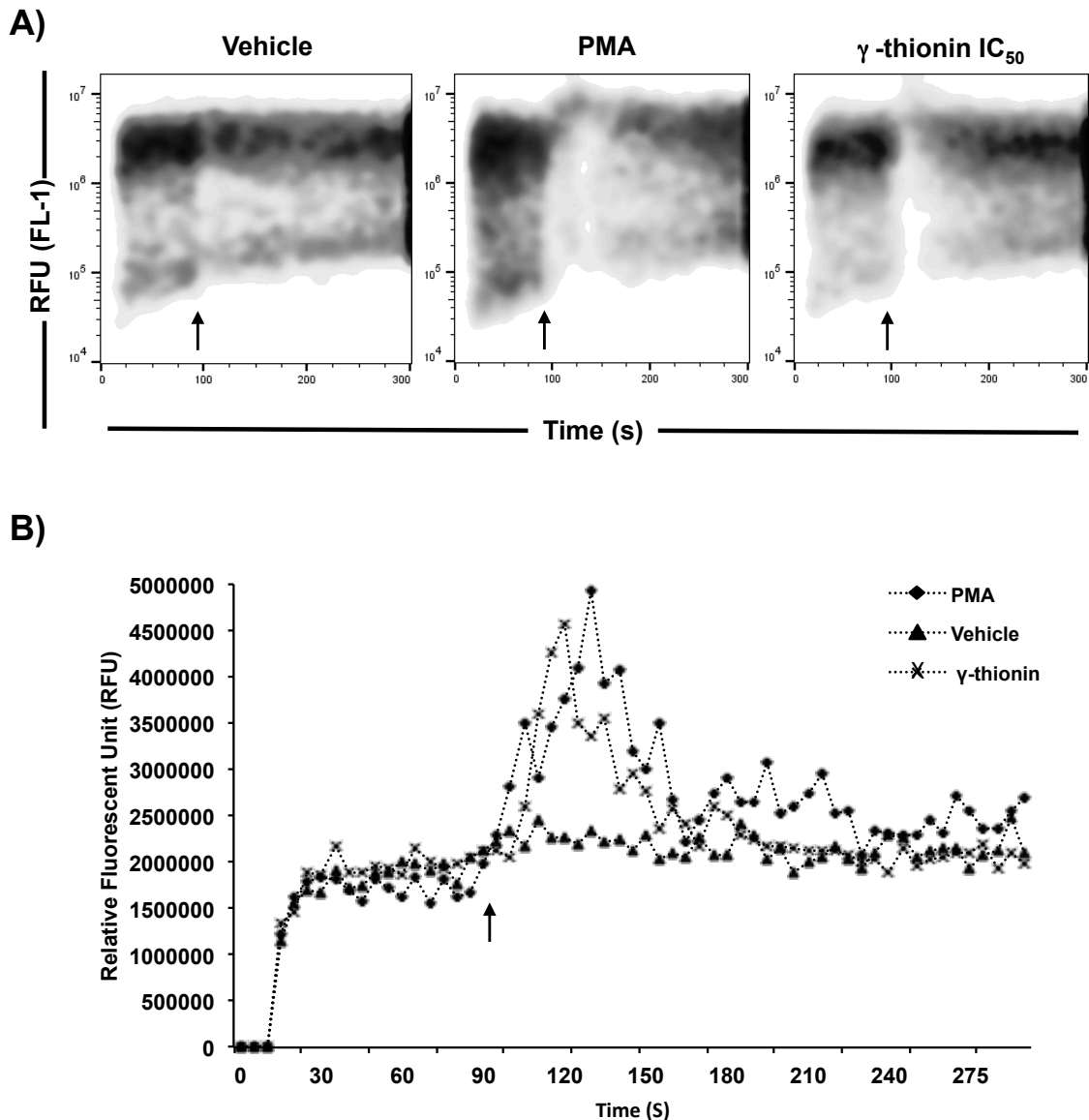


Figure 6. Intracellular calcium release from K562 cells is induced by γ -thionin defensin. The release of intracellular calcium was analyzed by flow cytometer using the Calcium Assay Kit (BD Biosciences). The panel shows representative plots **(A)** and relative fluorescence intensities for intracellular calcium release **(B)**. Measurements were performed for 6 min. PMA (3 μ M) was used as a positive control. Arrow indicates the time at which the treatments were added.

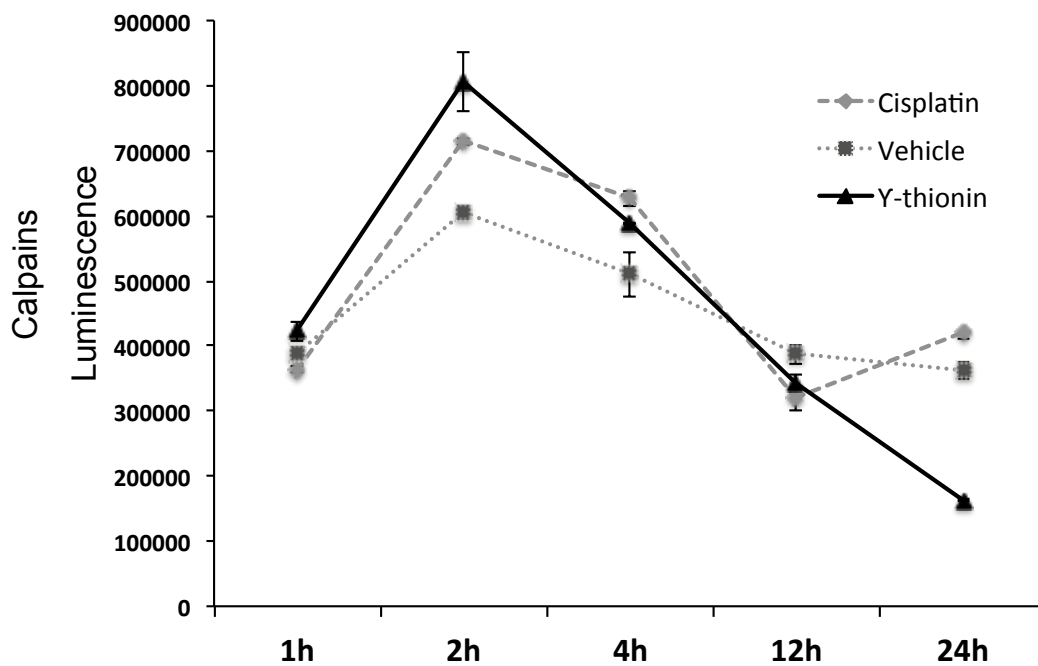


Figure 7. Activation of calpains in K562 cells treated with γ -thionin defensin. The inductions of calpains were measured in cells that were treated with IC_{50} γ -thionin (1, 2, 4, 12 and 24 h) by luminescence. Each point shows the mean of replicates \pm SE of three independent experiments. Cisplatin (1 μ g/ml) was used as a positive control.

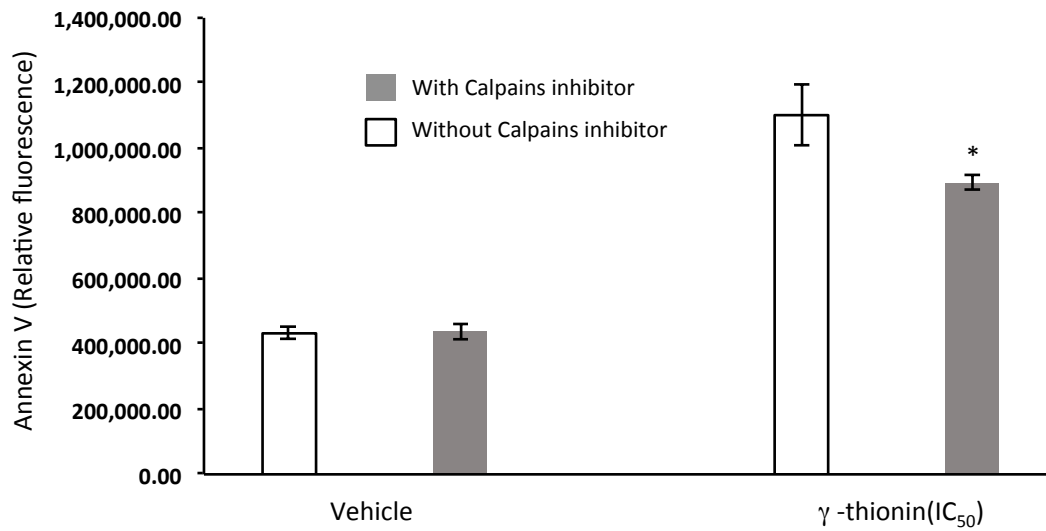


Figure 8. Participation of the calpains in the apoptosis activated by γ -thionin in K562 cells. Cells were treated 1 h with the calpain specific inhibitor N-Acetyl-Leu-Leu-normoleucinal (5 mg/ml), and then cells were treated 24 h with γ -thionin IC₅₀. Apoptosis was assessed by flow cytometry measuring the relative fluorescence of Annexin V. *Indicates statistically significant differences with respect to γ -thionin treatment ($P < 0.05$).

9.3. CAPÍTULO III.

“Pasado, Presente y Futuro de la Guerra contra el Cáncer” (Artículo de Portada)

Saber Más: Revista de Divulgación

Año 5, Número 28

Revista con Arbitraje Internacional y Comité Editorial
Registro ISSN: 2007-7041

A QUIEN CORRESPONDA
PRESENTE

Por este medio se extiende la CONSTANCIA DE PUBLICACIÓN DEL ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN TITULADO:

**“Pasado, Presente y Futuro de la Guerra contra el Cáncer”
(Artículo de Portada)**

Siendo autores **Luis José Flores Álvarez** y **Joel Edmundo López Meza**, a quienes se les conservan y respetan sus derechos intelectuales de autor y son responsables del contenido del artículo publicado en el Número 28 (Año 5: 18-23, con fecha de publicación del 23 de diciembre de 2016), de la revista de divulgación “Saber Más”, con Arbitraje Internacional (Registro ISSN: 2007-7041).

La Revista de divulgación Saber Más de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, se distribuye en forma electrónica en una periodicidad bimestral y no tiene fines de lucro.

Se extiende la presente CONSTANCIA DE PUBLICACIÓN DEL ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA, para los fines legales que convengan a los autores correspondientes.

ATENTAMENTE

Revista de Divulgación Saber Más

DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA
DIRECTOR DEL COMITÉ EDITORIAL

REVISTA DE DIVULGACIÓN “Saber Más”, ES UNA REVISTA CON ARBITRAJE Y COMITÉ INTERNACIONAL, SIN FINES DE LUCRO. LAS EXPRESIONES SON RESPONSABILIDAD DE LOS AUTORES. **COMITÉ EDITORIAL.** DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA (DIRECTOR), DR. HORACIO CANO CAMACHO (EDITOR), DR. RAUL CÁRDENAS NAVARRO, DRA. VANESSA GONZÁLEZ COVARRUBIAS, DRA. EL DEL VAL DE GORTARI, DR. LUIS MANUEL VILLASENOR CENDEJAS Y DR. JUAN CARLOS ARTEAGA VELÁZQUEZ.

Artículo
Portada

Pasado, Presente y Futuro de la guerra contra el cáncer

Luis José Flores Álvarez y
Joel Edmundo López Meza *



Se estima que cada año mueren en el mundo cerca de siete millones de personas a causa del cáncer, ubicándolo en una de las diez primeras causas de muerte a nivel mundial y la tercera en México. Según la definición establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la palabra "cáncer" es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Estas enfermedades tienen como característica la multiplicación rápida de células anormales que pueden invadir o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis, siendo ésta la principal causa de muerte por cáncer.

Aunque los carcinomas son una de las formas más frecuentes del cáncer, se conocen más de cien tipos distintos, ya que su desarrollo depende del órgano o tejido en el que se originan y el tipo de célula a partir del cual se forman. Aproximadamente un 90% de los cánceres son del tipo carcinoma, éstos se generan en los epitelios o capas celulares que recubren la superficie de nuestro cuerpo.

Por lo general, los cánceres son tumores que ocurren independientemente del género (hombres o mujeres) y aunque no hay una edad establecida para desarrollarse, la mayor frecuencia ocurre entre los 20 y 60 años de edad.

Los tumores se pueden clasificar en tumores líquidos (incluyen las leucemias) y los tumores sólidos. Los tumores sólidos tienen la característica de tener diferentes tipos de células y formar estructuras definidas o amorfas. Estos tumores tienen la mayor incidencia y mortalidad en el mundo.

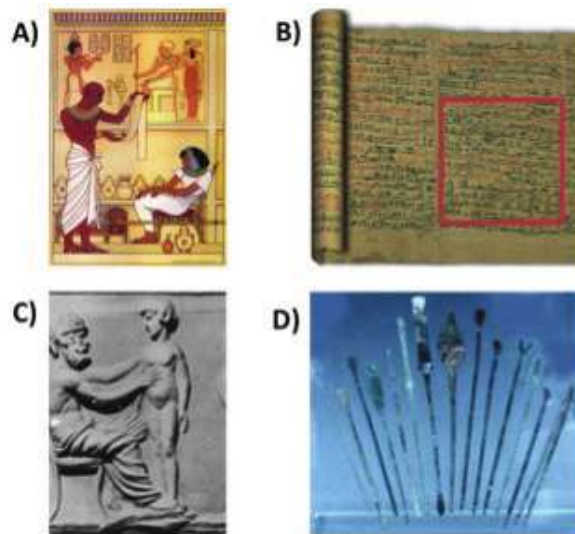
Los tratamientos usados para su control dependen del tipo de cáncer, la progresión y la edad; ya sea retirando las células enfermas o en

casos muy graves solo la aplicación de fármacos para aliviar el dolor. Los tratamientos de primera opción utilizados hasta el día de hoy son: La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia.

Breve Historia de los Tratamientos contra el Cáncer

El desarrollo y el perfeccionamiento de estos métodos inició hace aproximadamente 3,000 A.C con la cultura egipcia. Posteriormente los griegos y romanos acuñaron la palabra cáncer (del griego "karkinos" que significa cangrejo), además desarrollaron los primeros utensilios de cirugía y elaboraron las primeras descripciones de la enfermedad (cáncer de mama). Los registros soportan el hecho de que la cauterización (quemar el tejido afectado) fue una de las primeras técnicas empleadas.

Durante la Edad Media, los avances científico-tecnológicos en Europa se detuvieron (periodo denominado oscurantismo) y los estudios sobre el cáncer no fueron la excepción. Sin embargo, se perfeccionaron algunos utensilios y técnicas quirúrgicas relacionados con el tratamiento de esta enfermedad.



Primeros tratamientos contra el cáncer.
 A) Papiro de Edwin Smith. Representación gráfica de un médico del antiguo Egipto se muestra el tratamiento de un paciente con cáncer. (<http://medicina-a-su-servicio.webnode.com.co/nosotros/>, <http://arquehistoria.com/historias-el-cancer-de-mama-en-el-antiguo-egipto-415>)
 B) Papiro de Edwin Smith. Caso 45, en recuadro rojo se resalta el caso de cáncer de pecho, donde se describe la examinación, pronóstico, tratamiento y explicación de la enfermedad. (<https://ceb.nlm.nih.gov/proj/flash/smith/smith.html>)
 C) Los griegos y el cáncer. Imagen de un mural griego, donde posiblemente se ejemplifica la exploración física para identificación de tumores. (<http://www.crs-src.ca/page.aspx?pid=1969>)
 D) Utensilios romanos de cobre para cirugía. Utensilios utilizados por los romanos para las cirugías. (http://www.bordet.be/en/presentation/history/cancer_e/cancer2.htm)

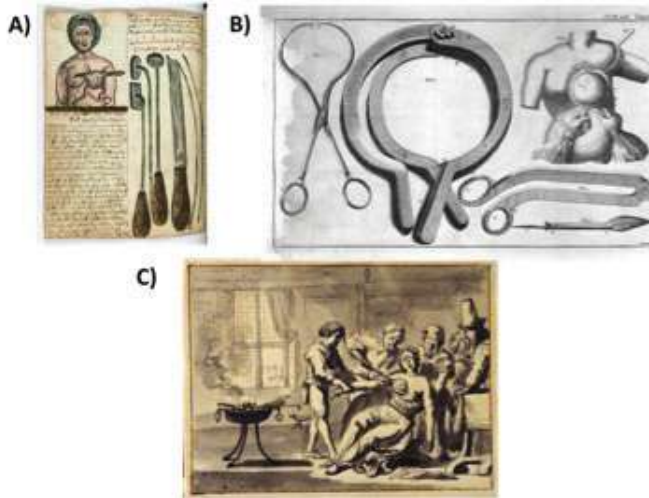
Primeros tratamientos contra el cáncer.

A) Primeras operaciones de cáncer en Europa. Compendio popular de medicina y cirugía. Ilustración de una mujer teniendo una operación de mama así como de los instrumentos usados en 1675. (http://allmyeyes.blogspot.mx/2011_10_01_archive.html)

B) Primeros instrumentos quirúrgicos para mastectomía. Instrumentos diseñados para retirar tumores de cáncer de mama.

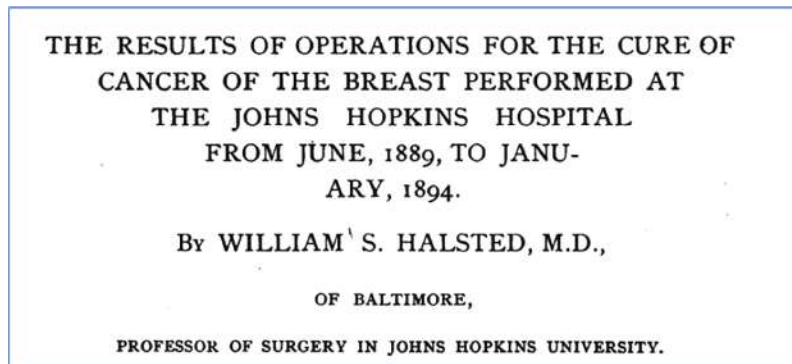
(<https://www.flickr.com/photos/internetarchivebookimages/14587191237/>)

C) Cirugías contra el cáncer en el siglo XVII. Ilustración donde se describe el procedimiento quirúrgico para retirar un tumor de mama. (http://allmyeyes.blogspot.mx/2011_10_01_archive.html)



Testimonios de esto se encuentran en manuales del siglo XVII que puntualizan herramientas utilizadas en las operaciones (cuchillos, pinzas y ganchos), así como los procedimientos para remover ciertos tumores sólidos, entre ellos, el cáncer de mama. Estos registros se encuentran en el compendio de cirugía y medicina descrita por la orden de los Franciscanos en Alemania en 1675.

El nacimiento de la oncología en 1761 (especialidad médica encargada de estudiar el cáncer), fue un evento que marcó el establecimiento de las técnicas actuales para la lucha contra el cáncer. El conocimiento generado permitió el desarrollo de avances en la búsqueda de terapias más efectivas y menos traumáticas para los pacientes. Algunos progresos que impactaron en el desarrollo de los tratamientos contra el cán-



Artículo original de William S. Halsted donde describe la técnica de la mastectomía en pacientes del hospital de Johns Hopkins en 1894.

cer fueron: el uso de la anestesia, el perfeccionamiento de las técnicas quirúrgicas (mastectomía) y el nacimiento de la radio y quimioterapia.

Tratamientos Actuales Contra el Cáncer

A mediados de los años 50's del siglo pasado ya se utilizaban de manera rutinaria los tres principales tratamientos contra el cáncer, que actualmente se usan: 1) la cirugía, 2) la radioterapia, y 3) la quimioterapia. Éstos, sustancialmente han salvado muchas vidas, a pesar de sus diversos efectos adversos asociados a su uso (baja eficiencia y efectos secundarios a la salud). Por estas razones se han explorado nuevos procedimientos con el fin de mejorar su eficiencia y disminuir los efectos adversos.

En los últimos 20 años se han innovado y desarrollado nuevos tratamientos, los que tienen como principal característica la mejora en la especificidad de atacar solo a las células cancerosas. El perfeccionamiento de la cirugía ha generado el desarrollo de la microcirugía (uso de micro cámaras), criocirugía (uso de nitrógeno líquido con temperaturas ultra-bajas) y la cirugía con láser (uso de luz de alta intensidad usado para reducir o destruir tumores), derivando en procedimientos menos invasivos. También se han implementado nuevas técnicas de quimioterapia, que son más efectivas a través de la combinación de fármacos nuevos o ya existentes, el uso de agentes quimio-protectores y la terapia dirigida (fármacos específicos para cada tipo de cáncer).

Tratamiento	Fundamento	Uso
Microcirugía	Sondas con micro-cámaras son utilizadas como guías para remover tejidos cancerosos o auxiliares en la cirugía.	Tratamiento de tumores poco desarrollados de fácil o difícil acceso.
Criocirugía	Uso de líquido extremadamente frío, usualmente <i>nitrógeno líquido</i> , <i>óxido nítrico</i> y <i>argón</i> .	Destrucción localizada de tumores, como en próstata, cuello uterino y piel.
Láser	Aplicación de haces de luz de alta intensidad.	Reducción o destrucción de tumores en estadios tempranos de cánceres como: cuello uterino, pene, vagina, vulva, pulmón, estómago, pólipos de colon. También utilizado como auxiliar en las cirugías para sellar terminaciones nerviosas y vasos linfáticos.



Turning the pages On line. U.S. National library of Medicine. <https://ceb.nlm.nih.gov/proj/flash/smith/smith.html>

Institut Jules Bordet. 2005. The History of Cancer. http://www.bordet.be/en/presentation/history/cancer_e/cancer1.htm

Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol>

Nuevas y Prometedoras Terapias Contra el Cáncer

Algunas de las nuevas terapias incluyen el uso de tratamientos hormonales, éstos bloquean la actividad hormonal en las células cancerosas, son utilizados para la prevención de algunos tipos de cánceres, como el de ovario y testículo. Una propuesta muy prometedora ha sido la generación de vacunas, ejemplo de ello es la elaborada contra el virus del papiloma humano. Además, se han desarrollado estrategias en donde se estimula el sistema inmune con elementos como los interferones, interleucinas, citocinas e inhibidores y la manipulación del sistema inmunológico de los pacientes (ej. cáncer de próstata y leucemia). Sin embargo, éstos aún se encuentran en proceso experimental o no se conocen los efectos secundarios por su reciente uso. El empleo de

TRATAMIENTO	FUNDAMENTO	BLANCO
Hormonas	Aplicación de antagonistas hormonales que disminuyen o detienen la proliferación de células cancerosas. Generalmente estos fármacos interfieren en la actividad de receptores de estrógenos (<i>Tamoxifeno</i> , <i>Flutamida</i> , <i>Fulvestrant</i>), en la producción de estrógenos (<i>Anastrozol</i>) o de forma general en la producción o actividad hormonal (<i>Megastrol</i>).	Tratamiento en pacientes con cáncer de seno(mama), próstata y testículo, principalmente.
Vacunas	Sustancias que apoyan, estimulan o restauran la habilidad del sistema inmune, para atacar agentes infecciosos que provocan ciertos tipos de cánceres.	Vacunas contra virus de papiloma humano (VPH) y hepatitis B, responsables de cáncer cervicouterino y de hígado, respectivamente. Vacuna de tratamiento para cáncer metastásico de próstata.
Terapia génica	Introducción de nuevo material genético (ADN, ARN) dentro de la célula para conseguir un beneficio terapéutico.	Se ha probado sobre algunos cánceres como de ovario, mama y melanoma.
Nanotecnología	Diseño de <i>nano-partículas</i> que reconocen blancos específicos, capaces de acarrear y controlar la liberación de medicamentos.	En fase experimental, se ha probado sobre tumores desarrollados en ducto biliar, en amígdalas y cuello uterino.

procedimientos innovadores, como el uso de fragmentos de ácidos nucleicos y nanotecnología para el acarreo de fármacos, además de mejores métodos de diagnóstico, son algunas de las nuevas propuestas para el tratamiento de algunas formas de cáncer.

¿Estamos Cerca de Ganar la Guerra Contra el Cáncer?

Es difícil dar una respuesta a esta

interrogante, ya que cada cáncer es distinto en origen y en cada individuo; sin embargo, la detección temprana permite que muchos de ellos sean curables o que se puedan controlar, permitiendo una mejor calidad de vida a los pacientes. El avance en las investigaciones científicas y el alcance médico de los resultados que se obtengan, es esencial para ganar esta guerra contra el cáncer.



Dr. Joel Edmundo López-Meza, es Profesor Investigador del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Sus líneas de investigación son: 1) Efectos inmunomoduladores de ácidos grasos y vitaminas en la interacción célula-patógeno. 2) Mecanismos citotóxicos de péptidos antimicrobianos de plantas en células de cáncer.

M.C. Luis José Flores-Álvarez, es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ. Su proyecto de investigación está enfocado en evaluar los mecanismos de citotoxicidad de péptidos antimicrobianos de origen vegetal, particularmente de chile habanero y aguacate nativo, en células de leucemia humana.



10. DISCUSIÓN GENERAL

En la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento contra el cáncer, los péptidos antimicrobianos o PA's son considerados una opción atractiva debido a su citotoxicidad y especificidad [1, 26, 36-38, 40]. Las plantas son una fuente importante de PA's y aunque en varios estudios se ha evaluado su actividad citotóxica, poco se ha avanzado en el conocimiento del(de los) mecanismo(s) por el cual actúan [36]. En este sentido, en el presente trabajo se determinó el mecanismo de muerte inducido por las defensinas PaDef y γ -tionina, derivadas del aguacate y del chile habanero, respectivamente, en la línea celular humana K562 de leucemia mieloide crónica.

Las defensinas PaDef y γ -tionina mostraron citotoxicidad sobre la línea celular K562 de manera dependiente de la concentración. A partir de las evaluaciones de citotoxicidad en esta línea celular se obtuvo una IC_{50} de 97.3 $\mu\text{g/ml}$ (18.65 μM) y 290 $\mu\text{g/ml}$ (50.26 μM) para PaDef y γ -tionina, respectivamente. Ambas concentraciones se encuentran en el intervalo reportado para otras defensinas de plantas probadas en la línea celular de leucemia humana HL60, como la coccinina (30 μM) [190], faseococina (40 μM) [132]; y en la línea celular de leucemia murina (M1) como la gimnina (50 μM) [219]. Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó que la defensina PaDef posee citotoxicidad sobre células de cáncer de mama MCF-7 con una IC_{50} de 141.62 $\mu\text{g/ml}$ (27.23 μM) [128], la cual es una concentración mayor a la requerida para provocar el mismo efecto en las células de leucemia (18.65 μM). Asimismo, la defensina γ -tionina fue citotóxica para las células MCF-7 con una IC_{50} de 117.29 $\mu\text{g/ml}$ (20.58 μM); sin embargo, la citotoxicidad de este péptido fue menor sobre las células K562 (50.26 μM). Las diferencias en la citotoxicidad observadas pueden deberse a factores particulares del péptido (composición de residuos, longitud, carga, hidrofobicidad, anfipaticidad), así como a la estructura y composición de la membrana de la célula blanco (contenido de fosfatidilserina, residuos de ácido siálico, glicanos sulfatados, colesterol, receptores) [215]. Es interesante resaltar que, respecto a las características de las defensinas, PaDef tiene una carga neta de +4.17 y un índice de hidrofobicidad de 0.34, mientras que γ -tionina posee una carga de +5.99 y un índice hidrofobicidad de 0.14. El perfil de hidrofobicidad de PaDef es

2 veces mayor que γ -tionina, lo cual, sumado a su carga, sugiere que tiene mayor afinidad hacia las regiones hidrofóbicas de la membrana citoplasmática de las células de leucemia [216]. Respecto a la célula blanco, como se mencionó existen varios elementos que le permiten a la célula cancerosa tener una carga negativa y favorecer así la interacción de los PA's, entre el que destaca el fosfolípido fosfatidilserina, el cual es muy abundante en la parte externa de la membrana de las células cancerosas y ausente en las células normales [215]. En este sentido, de acuerdo a lo descrito en la literatura, en general no existen diferencias sustanciales en las IC_{50} de los diferentes PA's de plantas evaluados en células de leucemias, lo cual puede atribuirse a que la composición de la membrana citoplasmática de las células de leucemia es muy similar [220], contrario a lo reportado con otras células cancerosas de origen distinto (p. ej. MCF-7), cuya composición es muy diferente [218]. Sin embargo, de manera particular las diferencias de la IC_{50} de PaDef y γ -tionina sobre las células de leucemia K562 se podría asociar principalmente por las características fisicoquímicas de los PA's. Hipotéticamente, la interacción de PaDef con la membrana de la célula blanco podría favorecerse por el núcleo hidrófobo que posee, provocando la activación de algún elemento membranal involucrado en la apoptosis de la vía extrínseca (p. ej. receptor). En el caso de la defensina γ -tionina, se sugiere que debido a su carga positiva (+5.99) y bajo índice hidrófobo, se favorece su interacción con las cargas negativas de la parte externa de la membrana de la célula, pero requiere alcanzar un umbral de concentración que favorezca la formación de algún tipo de estructura (p. ej. poro transitorio), el cual le permitiría ingresar a la célula y actuar en algún blanco intracelular. Esto último podría explicarse por que se requiere una concentración 2.5 veces mayor de este PA con respecto a PaDef. Sin embargo, se requiere realizar experimentos adicionales que permitan probar estas hipótesis.

Por otro lado, ninguna de las defensinas mostró actividad citotóxica sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Esto coincide con lo reportado en nuestro grupo de trabajo para ambas defensinas [128, 170]. Resultados similares se han descrito para las defensinas de plantas faseococcina [185], coccinina [184], defensina "purple pole" [171]. Esta

selectividad de las defensinas PaDef y γ -tionina se podría atribuir parcialmente a que las células normales carecen de carga en su membrana plasmática (carga zwitteriónica) [106], por lo tanto, no se favorece la interacción con moléculas catiónicas, como es el caso de las defensinas. Hasta nuestro conocimiento este es el primer reporte de citotoxicidad de las defensinas de plantas PaDef y γ -tionina sobre células de leucemia K562, así como de una posible selectividad hacia células normales.

Los mecanismos de citotoxicidad de las defensinas de plantas se han estudiado poco [36]. Sin embargo, el mecanismo de muerte celular mejor descrito es la necrosis (lisis celular), como es el caso de las defensinas TPP3 (*Lycopersicon esculentum*) en células HeLa, U937 [187], y NaD1 (*Nicotiana glauca*) en células de cáncer U937, HeLa, MM170 y Jurkat [125]. La necrosis ocurre por la desestabilización y permeabilización de la membrana celular, resultado de la interacción directa de la defensina con el fosfolípido de la membrana plasmática fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) [125, 126]. De manera interesante, ambas defensinas de estudio no provocaron daño a la membrana plasmática, lo cual descarta un mecanismo necrótico. Sin embargo, los péptidos PaDef y γ -tionina inducen apoptosis (Capítulos 1 y 2) en las células K562, lo cual coincide con lo reportado para las defensinas de plantas, como es el caso de PaDef sobre células de cáncer de mama (MCF-7) [128], RsAFP2 y HsAFP1 en *Candida albicans* [221, 222]. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer reporte de defensinas de plantas que inducen apoptosis en células de leucemia. Sin embargo, la inducción de apoptosis en este tipo de células se ha reportado para algunos PA's de origen animal como la lactoferricina de bovino (LfcinB6, LfcinB), Pep2, Pep3, cecropina CB1a, entre otros [105].

La apoptosis puede ser clasificada como dependiente de caspasas e independiente de caspasas. La apoptosis dependiente de caspasas ocurre por la vía extrínseca (mediada por receptores transmembranales) o por la vía intrínseca (mediada por la mitocondria) [64-66], y por una vía independiente de caspasas que es mediada por la activación de las calpaínas [66]. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la defensina PaDef induce la apoptosis en las células K562 por la vía extrínseca (Capítulo 1), además de favorecer una respuesta inflamatoria por la secreción de TNF- α , de manera

similar a lo reportado para γ -tionina en células de epitelio mamario bovino [217]. El incremento en la secreción de TNF- α podría favorecer la activación de la apoptosis vía extrínseca, como previamente se ha descrito [223].

Por su parte, la defensina γ -tionina indujo la apoptosis independiente de caspasas mediada por calpaínas (Capítulo 2). Hasta nuestro conocimiento este es el primer reporte en el que se describe este mecanismo de acción citotóxico para un péptido antimicrobiano de plantas, el cual solo se ha descrito para la catelicidina humana LL-37 en células Jurkat [70]. Por consiguiente, la activación de esta ruta independiente de caspasas sugiere que la defensina γ -tionina, por sus propiedades estructurales, puede interactuar con el núcleo hidrofóbico de la membrana lo que facilita la formación de poros transitorios y posibilita su internalización para activar mecanismos internos como la inducción de apoptosis intrínseca [216,224,225] o la independiente de caspasas; sin embargo, se requieren de otros estudios que permitan evaluar si el péptido se internaliza en las células K562.

Finalmente, en las defensinas de plantas se ha reportado una diversidad de blancos celulares sobre los cuales actúan, lo que permite postular su uso como una terapia en diferentes tipos de células cancerosas. Esta diversidad de blancos de acción podría contribuir a solucionar los problemas que tienen algunos fármacos en el tratamiento contra el cáncer, principalmente su inespecificidad y la capacidad de desarrollar resistencia al tratamiento convencional. Los resultados obtenidos en esta investigación contribuyen a entender el mecanismo por el cual las defensinas PaDef y γ -tionina activan mecanismos de apoptosis distintos en las células de leucemia K562. Sin embargo, el posible uso terapéutico de ambos péptidos en contra del cáncer, requiere de más estudios (ej. probarlos en distintas líneas celulares y modelos biológicos *in vivo*) que permitan determinar su potencial en una posible terapia.

11. CONCLUSIÓN GENERAL

En las células de leucemia mieloide K562 la defensina PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) fue citotóxica ($IC_{50} = 97.3 \mu\text{g/ml}$) a través de la activación de la apoptosis extrínseca, probablemente mediada por TNF- α . Mientras que la citotoxicidad de γ -tionina (*Capsicum chinense*) ($IC_{50} = 290 \mu\text{g/m}$) hacia las células K562 fue mediada por la inducción de la apoptosis independiente de caspasas, en la cual participan las calpaínas. Estas actividades sugieren que estas defensinas podrían ser moléculas potenciales en el tratamiento de leucemias humanas.

12. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

1. Hoskin, David W., and Ayyalusamy Ramamoorthy. 2008. "Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (2). Elsevier: 357–75. doi:10.1016/J.BBAMEM.2007.11.008.
2. Vogelstein, Bert, and Kenneth W Kinzler. 2004. "Cancer Genes and the Pathways They Control." *Nature Medicine* 10 (8). Nature Publishing Group: 789–99. doi:10.1038/nm1087.
3. Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144 (5). Cell Press: 646–74. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013.
4. Organización Mundial de la Salud. 2012. "Cáncer. Nota descriptiva No. 297". Recuperado el 1 de julio del 2014, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
5. International Agency for Research on Cancer. 2014. "GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012". Recuperada el 1 de julio del 2015 de: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
6. Siegel, Rebecca, Deepa Naishadham, and Ahmedin Jemal. 2012. "Cancer Statistics, 2012." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 62 (1): 10–29. doi:10.3322/caac.20138.
7. Organización Panamericana de la Salud. 2014. "Organización Mundial de la Salud (2012). México". Recuperada el 1 de julio del 2014 de: <http://www.paho.org/mex/>.
8. Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS]. 2013. "Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos". Recuperado el 10 de enero de 2014 de: <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
9. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. 2013. "Hematopoiesis. Development" (Cambridge, England). 140(12):2463-2467. doi:10.1242/dev.083147.
10. Tirado-Gómez LL and Mohar-Betancourt A. 2007. "Epidemiología de las neoplasias hematológicas". *Instituto Nacional Cancerología*. 2:109-20.
11. Ferlay, Jacques, Hai-Rim Shin, Freddie Bray, David Forman, Colin Mathers, and Donald Maxwell Parkin. 2010. "Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *International Journal of Cancer* 127 (12). Wiley-Blackwell: 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516.
12. Siteman Cancer Center. 2014. "NK Cell (Patient) - Siteman Cancer Center". Recuperado el enero 2018, de: <https://siteman.wustl.edu/glossary/cdr0000044439/>.
13. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica- Secretaria de Salud. 2012. "Perfiles Epidemiológicos de los Tumores malignos en México".

- Recuperado el 1 de agosto de 2015. https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p_epi_de_los_tumores_malignos_mc3a9xico.pdf.
14. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2018. "Estudian Incremento de La Mortalidad Por Leucemia Linfoblástica En México". Recuperado el 1 de agosto de 2018. <http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/salud/3628-incrementa-la-mortalidad-por-leucemia-linfoblastica-aguda-en-mexico>.
 15. Leukemia and Lymphoma Society. 2018. "Chronic Lymphocytic Leukemia". Recuperado el 1 de agosto de 2018. <https://www.lls.org>.
 16. Terwilliger, T, and M Abdul-Hay. 2017. "Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comprehensive Review and 2017 Update." *Blood Cancer Journal* 7 (6). Nature Publishing Group: e577. doi:10.1038/bcj.2017.53.
 17. Kouchkovsky, I De, and M Abdul-Hay. 2016. "'Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Review and 2016 Update'." *Blood Cancer Journal* 6 (7). Nature Publishing Group: e441. doi:10.1038/bcj.2016.50.
 18. Fialkow, Philip. J, Robert J. Jacobson, and Thalia Papayannopoulou. 1977. "Chronic Myelocytic Leukemia: Clonal Origin in a Stem Cell Common to the Granulocyte, Erythrocyte, Platelet and Monocyte/macrophage." *The American Journal of Medicine* 63 (1). Elsevier: 125–30. doi:10.1016/0002-9343(77)90124-3.
 19. Fialkow, P. J, S. M Gartler, and A. Yoshida. 1967. "Clonal Origin of Chronic Myelocytic Leukemia in Man." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (4). National Academy of Sciences: 1468–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5237880>.
 20. Jabbour, Elias, and Hagop Kantarjian. 2016. "Chronic Myeloid Leukemia: 2016 Update on Diagnosis, Therapy, and Monitoring." *American Journal of Hematology* 91 (2). Wiley-Blackwell: 252–65. doi:10.1002/ajh.24275.
 21. Cortes, Jorge. E, Moshe Talpaz, and Hagop Kantarjian. 1996. "Chronic Myelogenous Leukemia: A Review." *The American Journal of Medicine* 100 (5): 555–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8644769>.
 22. National Cancer Center (2018). NCI Dictionary of Cancer Terms. Recuperado el 1 de enero de 2018. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/philadelphia-chromosome>.
 23. Ibarra Martha, Alvarado, Ortiz Zepeda Maricela, Álvarez Vera José, Espitia Ríos María Eugenia, and Jiménez. M. Alvarado Rosa. 2016. "Disease-free survival in patients over 40 years of age with ph lymphoblastic leukemia treated with an intensive protocol." *Revista de Hematología* 17(1):34-62
 24. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2017. "Estadísticas a propósito del Día Mundial Contra el Cáncer (4 de Febrero)".

- Recuperado el 1 de septiembre del 2017. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf.
25. Instituto Nacional del Cáncer. 2017. "Tipos de Tratamientos". Recuperado el 1 de agosto de 2017. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>.
 26. Espinosa, Enrique, Pilar Zamora, Jaime Feliu, and Manuel González Barón. 2003. "Classification of Anticancer Drugs—a New System Based on Therapeutic Targets." *Cancer Treatment Reviews* 29 (6). W.B. Saunders: 515–23. doi:10.1016/S0305-7372(03)00116-6.
 27. Instituto Nacional del Cáncer. 2017. "Hoja informativa radioterapia". Recuperado el 1 de agosto de 2017. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia/hoja-informativa-radioterapia>.
 28. Instituto Nacional del Cáncer. 2016. "Como funcionan los medicamentos de quimioterapia". Recuperado el 1 de agosto de 2017. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia/hoja-informativa-radioterapia>.
 29. Savarese, Diane M.F, Gayle Savy, Linda Vahdat, Paul E Wischmeyer, and Barbara Corey. 2003. "Prevention of Chemotherapy and Radiation Toxicity with Glutamine." *Cancer Treatment Reviews* 29 (6). W.B. Saunders: 501–13. doi:10.1016/S0305-7372(03)00133-6.
 30. Instituto Nacional del Cáncer. 2015. "Tratamiento del cáncer". Recuperado el 1 de agosto de 2016. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento>.
 31. Instituto Nacional del Cáncer. 2018. "Quimioterapia para la leucemia mieloide crónica". Recuperado el 1 de agosto de 2018. <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-cronica/tratamiento/quimioterapia.html>.
 32. Röllig, Christoph, Carsten Müller-Tidow, Andreas Hüttmann, Richard Noppeney, Volker Kunzmann, Claudia D. Baldus, Christian H. Brandts, Krämer, Alwin, Schäfer-Eckart, Kerstin, Neubauer, Andreas, Krause, Stefan W, Giagounidis, Aristoteles, Aulitzky, Walter E, Bornhäuser, Martin, Schaich, Markus, Parmentier, Stefani B, Thiede, Christian, von Bonin, Malte, Schetelig, Johannes, Kramer, Michael, Serve, Hubert, Berdel, Wolfgang E, and Ehninger, Gerhard. 2014. "Sorafenib Versus Placebo in Addition to Standard Therapy in Younger Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Results from 267 Patients Treated in the Randomized Placebo-Controlled SAL-Soram1 Trial." *Blood* 124 (21). <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/6?sso-checked=true>.
 33. American Society Clinical Oncology. 2017. "Immunotherapy 2.0 Named Advance of the Year in ASCO's 12th Annual Cancer Progress Report". Recuperado el 1 de febrero de 2018. <https://www.asco.org/about->

- asco/press-center/news-releases/immunotherapy-20-named-advance-year-asco%E2%80%99s-12th-annual-cancer.
34. American Cancer Society. 2014. "What's New in Acute Lymphocytic Leukemia Research and Treatment?". Recuperado el 1 de agosto de 2016. <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/new-research.html>.
 35. Turtle, Cameron J., Laïla-Aïcha Hanafi, Carolina Berger, Theodore A. Gooley, Sindhu Cherian, Michael Hudecek, Daniel Sommermeyer, Melville Katherine, Pender Barbara, Budiarto Tanya M, Robinson Emily, Steevens Natalia N, Chaney Colette, Soma Lorinda, Chen Xueyan, Yeung Cecilia, Wood Brent, Li Daniel, Cao Jianhong Heimfeld, Shelly Jensen, Michael C. Riddell, Stanley R, and Maloney, David G. 2016. "CD19 CAR-T Cells of Defined CD4+:CD8+ Composition in Adult B Cell ALL Patients." *The Journal of Clinical Investigation* 126 (6). American Society for Clinical Investigation: 2123–38. doi:10.1172/JCI85309.
 36. Guzmán-Rodríguez, Jaquelina Julia, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Rodolfo López-Gómez, and Joel E. López-Meza. 2015. "Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents." *BioMed Research International* 2015 (March). Hindawi: 1–11. doi:10.1155/2015/735087.
 37. Peters, Brian M, Mark E Shirliff, and Mary Ann Jabra-Rizk. 2010. "Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs?" *PLoS Pathogens* 6 (10). Public Library of Science: e1001067. doi:10.1371/journal.ppat.1001067.
 38. Papo, Niv, Dalia Seger, Arik Makovitzki, Vyacheslav Kalchenko, Zelig Eshhar, Hadassa Degani, and Yechiel Shai. 2006. "Inhibition of Tumor Growth and Elimination of Multiple Metastases in Human Prostate and Breast Xenografts by Systemic Inoculation of a Host Defense-Like Lytic Peptide." *Cancer Res* 66 (10): 5371–78. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4569.
 39. Olaku, Oluwadamilola, and Jeffrey D. White. 2011. "Herbal Therapy Use by Cancer Patients: A Literature Review on Case Reports." *European Journal of Cancer* 47 (4). Elsevier: 508–14. doi:10.1016/j.ejca.2010.11.018.
 40. Al-Benna, Sammy, Yechiel Shai, Frank Jacobsen, and Lars Steinstraesser. 2011. "Oncolytic Activities of Host Defense Peptides." *International Journal of Molecular Sciences* 12 (11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI): 8027–51. doi:10.3390/ijms12118027.
 41. Kalyanaraman, B, Joy Joseph, Shashi Kalivendi, Suwei Wang, Eugene Konorev, and Srigiridhar Kotamraju. 2018. "Doxorubicin-Induced Apoptosis: Implications in Cardiotoxicity." *Molecular and Cellular Biochemistry* 234-235 (1-2): 119–24. Accessed May 2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162424>.

42. Anassi, Enock, and Uche Anadu Ndefo. 2011. "Sipuleucel-T (provenge) Injection: The First Immunotherapy Agent (vaccine) for Hormone-Refractory Prostate Cancer." *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* 36 (4). MediMedia, USA: 197–202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572775>.
43. Cancer Research UK .2016. "Others treatments". Recuperado de 1 agosto de 2017. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/other>
44. Nikolettou, Vassiliki, Maria Markaki, Konstantinos Palikaras, and Nektarios Tavernarakis. 2013. "Crosstalk between Apoptosis, Necrosis and Autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12). Elsevier: 3448–59. doi:10.1016/J.BBAMCR.2013.06.001.
45. Castedo, Maria, Jean-Luc Perfettini, Thomas Roumier, Karine Andreau, Rene Medema, and Guido Kroemer. 2004. "Cell Death by Mitotic Catastrophe: A Molecular Definition." *Oncogene* 23 (16). Nature Publishing Group: 2825–37. doi:10.1038/sj.onc.1207528.
46. Yuan, Junying, Marta Lipinski, and Alexei Degterev. 2003. "Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death." *Neuron* 40 (2). Cell Press: 401–13. doi:10.1016/S0896-6273(03)00601-9.
47. Zong, Wei-Xing, and Craig B Thompson. 2006. "Necrotic Death as a Cell Fate." *Genes & Development* 20 (1). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1–15. doi:10.1101/gad.1376506.
48. Majno, G, and I Joris. 1995. "Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death." *The American Journal of Pathology* 146 (1). American Society for Investigative Pathology: 3–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7856735>.
49. Proskuryakov, S. Ya, V L Gabai, and A G Konoplyannikov. 2002. "Necrosis Is an Active and Controlled Form of Programmed Cell Death." *Biochemistry (Moscow)* 67 (4). Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers: 387–408. doi:10.1023/A:1015289521275.
50. Kroemer, G, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, El-Deiry, W. S, Golstein, P, Green, D. R Hengartner, M, Knight, R .A, Kumar, S, Lipton, S. A, Malorni, W, Nuñez, G, Peter, M. E, Tschopp, J, Yuan, J, Piacentini, M, Zhivotovsky, B, and Melino, G. 2009. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death & Differentiation* 16 (1). Nature Publishing Group: 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150.
51. Los, Marek, Malgorzata Mozoluk, Davide Ferrari, Anna Stepczynska, Christopher Stroh, Andrea Renz, Zdenko Herceg, Zhao-Qi Wang, and Klaus Schulze-Osthoff. 2002. "Activation and Caspase-Mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling." *Molecular Biology of the Cell* 13

- (3). American Society for Cell Biology: 978–88. doi:10.1091/mbc.01-05-0272.
52. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4). Nature Publishing Group: 239–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027>.
53. Wyllie A. H., Kerr J.F., and A.R. Currie. 1980. "Cell death: the significance of apoptosis". *International Review of Cytology*. 68, 251–306.
54. Labbé, Katherine, and Maya Saleh. 2011. "Pyroptosis: A Caspase-1-Dependent Programmed Cell Death and a Barrier to Infection." In *The Inflammasomes*, 17–36. Basel: Springer Basel. doi:10.1007/978-3-0348-0148-5_2.
55. Haworth, Robert A., and Douglas R. Hunter. 1979. "The Ca²⁺-Induced Membrane Transition in Mitochondria: II. Nature of the Ca²⁺ Trigger Site." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 195 (2). Academic Press: 460–67. doi:10.1016/0003-9861(79)90372-2.
56. Hunter, Douglas R., and Robert A. Haworth. 1979. "The Ca²⁺-Induced Membrane Transition in Mitochondria: I. The Protective Mechanisms." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 195 (2). Academic Press: 453–59. doi:10.1016/0003-9861(79)90371-0.
57. Marnett, L. J. 2000. "Oxyradicals and DNA Damage." *Carcinogenesis* 21 (3): 361–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688856>.
58. Ricci, M. Stacey, and Wei-Xing Zong. 2006. "Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways." *The Oncologist* 11 (4). AlphaMed Press: 342–57. doi:10.1634/theoncologist.11-4-342.
59. Golstein, Pierre, and Guido Kroemer. 2007. "Cell Death by Necrosis: Towards a Molecular Definition." *Trends in Biochemical Sciences* 32 (1). Elsevier Current Trends: 37–43. doi:10.1016/J.TIBS.2006.11.001.
60. Vaux, D. L., I. L. Weissman, and S. K. Kim. 1992. "Prevention of Programmed Cell Death in *Caenorhabditis Elegans* by Human Bcl-2." *Science (New York, N.Y.)* 258 (5090): 1955–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470921>.
61. Hengartner, M. O., and H. R. Horvitz. 1994. "C. *Elegans* Cell Survival Gene Ced-9 Encodes a Functional Homolog of the Mammalian Proto-Oncogene Bcl-2." *Cell* 76 (4): 665–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907274>.
62. Kinnally, Kathleen W., Pablo M. Peixoto, Shin-Young Ryu, and Laurent M. Dejean. 2011. "Is mPTP the Gatekeeper for Necrosis, Apoptosis, or Both?" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (4). Elsevier: 616–22. doi:10.1016/J.BBAMCR.2010.09.013.
63. Smith, Christopher C.T., and Derek M. Yellon. 2011. "Necroptosis, Necrostatins and Tissue Injury." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (9). Wiley/Blackwell (10.1111): 1797–1806. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01341.x.

64. Danial, Nika N, and Stanley J Korsmeyer. 2004. "Cell Death: Critical Control Points." *Cell* 116 (2). Cell Press: 205–19. doi:10.1016/S0092-8674(04)00046-7.
65. Nagata, Shigekazu. 1997. "Apoptosis by Death Factor." *Cell* 88 (3). Elsevier: 355–65. doi:10.1016/S0092-8674(00)81874-7.
66. Cory, Suzanne, and Jerry M. Adams. 2002. "The bcl2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-Death Switch." *Nature Reviews Cancer* 2 (9). Nature Publishing Group: 647–56. doi:10.1038/nrc883.
67. Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35 (4). NIH Public Access: 495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
68. Los, Marek, Sebastian Wesselborg, and Klaus Schulze-Osthoff. 1999. "The Role of Caspases in Development, Immunity, and Apoptotic Signal Transduction: Lessons from Knockout Mice." *Immunity* 10 (6). Cell Press: 629–39. doi:10.1016/S1074-7613(00)80062-X.
69. Leloup, Ludovic, and Alan Wells. 2011. "Calpains as Potential Anti-Cancer Targets." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15 (3). NIH Public Access: 309–23. doi:10.1517/14728222.2011.553611.
70. Mader, Jamie S, Neeloffer Mookherjee, Robert E W Hancock, and R Chris Bleackley. 2009. "The Human Host Defense Peptide LL-37 Induces Apoptosis in a Calpain- and Apoptosis-Inducing Factor-Dependent Manner Involving Bax Activity." *Molecular Cancer Research: MCR* 7 (5). American Association for Cancer Research: 689–702. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0274.
71. Lum, Julian J, Ralph J. DeBerardinis, and Craig B. Thompson. 2005. "Autophagy in Metazoans: Cell Survival in the Land of Plenty." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (6). Nature Publishing Group: 439–48. doi:10.1038/nrm1660.
72. Rikiishi, Hidemi. 2012. "Novel Insights into the Interplay between Apoptosis and Autophagy." *International Journal of Cell Biology* 2012 (March). Hindawi: 1–14. doi:10.1155/2012/317645
73. Klionsky, Daniel J. 2005. "The Molecular Machinery of Autophagy: Unanswered Questions." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 1). NIH Public Access: 7–18. doi:10.1242/jcs.01620.
74. Santambrogio, Laura, and Ana M. Cuervo. 2011. "Chasing the Elusive Mammalian Microautophagy." *Autophagy* 7 (6): 652–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460618>.
75. Tooze, Sharon A, and Tamotsu Yoshimori. 2010. "The Origin of the Autophagosomal Membrane." *Nature Cell Biology* 12 (9). Nature Publishing Group: 831–35. doi:10.1038/ncb0910-831.
76. Yang, Zhifen, and Daniel J Klionsky. 2010. "Eaten Alive: A History of Macroautophagy." *Nature Cell Biology* 12 (9). NIH Public Access: 814–22. doi:10.1038/ncb0910-814.
77. Sarkar, Sovan. 2013. "Regulation of Autophagy by mTOR-Dependent

- and mTOR-Independent Pathways: Autophagy Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Therapeutic Application of Autophagy Enhancers.” *Biochemical Society Transactions* 41 (5). Portland Press Limited: 1103–30. doi:10.1042/BST20130134.
78. Nakatogawa, Hitoshi. 2013. “Two Ubiquitin-like Conjugation Systems That Mediate Membrane Formation during Autophagy.” *Essays in Biochemistry* 55 (September). Portland Press Limited: 39–50. doi:10.1042/bse0550039.
 79. Mizushima, Noboru. 2007. “Autophagy: Process and Function.” *Genes & Development* 21 (22). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2861–73. doi:10.1101/gad.1599207.
 80. Mizushima, Noboru, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, Yae Tanaka, Tomoko Ishii, Michael D. George, Daniel J. Klionsky, Mariko Ohsumi, and Yoshinori Ohsumi. 1998. “A Protein Conjugation System Essential for Autophagy.” *Nature* 395 (6700). Nature Publishing Group: 395–98. doi:10.1038/26506.
 81. Tanida, Isei, Takashi Ueno, and Eiki Kominami. 2008. “LC3 and Autophagy.” In , 77–88. Humana Press. doi:10.1007/978-1-59745-157-4_4.
 82. Nikolettou, Vassiliki, Maria Markaki, Konstantinos Palikaras, and Nektarios Tavernarakis. 2013. “Crosstalk between Apoptosis, Necrosis and Autophagy.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12). Elsevier: 3448–59. doi:10.1016/J.BBAMCR.2013.06.001.
 83. Vercammen, D, G Brouckaert, G Denecker, M Van de Craen, W Declercq, W Fiers, and P Vandenabeele. 1998. “Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation of Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways.” *The Journal of Experimental Medicine* 188 (5). The Rockefeller University Press: 919–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730893>.
 84. Chan, Francis Ka-Ming, Joanna Shisler, Jacqueline G. Bixby, Martin Felices, Lixin Zheng, Michael Appel, Jan Orenstein, Bernard Moss, and Michael J. Lenardo. 2003. “A Role for Tumor Necrosis Factor Receptor-2 and Receptor-Interacting Protein in Programmed Necrosis and Antiviral Responses.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51613–21. doi:10.1074/jbc.M305633200.
 85. Holler, Nils, Rossana Zaru, Olivier Micheau, Margot Thome, Antoine Attinger, Salvatore Valitutti, Jean-Luc Bodmer, Pascal Schneider, Brian Seed, and Jürg Tschopp. 2000. “Fas Triggers an Alternative, Caspase-8-independent Cell Death Pathway Using the Kinase RIP as Effector Molecule.” *Nature Immunology* 1 (6). Nature Publishing Group: 489–95. doi:10.1038/82732.
 86. Jouan-Lanhouet, S, M I Arshad, C Piquet-Pellorce, C Martin-Chouly, G Le Moigne-Muller, F Van Herreweghe, N Takahashi, Sergent O,

- Lagadic-Gossmann D, Vandenabeele P, Samson, M, and Dimanche-Boitrel, M-T. 2012. "TRAIL Induces Necroptosis Involving RIPK1/RIPK3-Dependent PARP-1 Activation." *Cell Death & Differentiation* 19 (12). Nature Publishing Group: 2003–14. doi:10.1038/cdd.2012.90.
87. Vandenabeele, Peter, Lorenzo Galluzzi, Tom Vanden Berghe, and Guido Kroemer. 2010. "Molecular Mechanisms of Necroptosis: An Ordered Cellular Explosion." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (10). Nature Publishing Group: 700–714. doi:10.1038/nrm2970.
88. Cho, YoungSik, Sreerupa Challa, David Moquin, Ryan Genga, Tathagat Dutta Ray, Melissa Guildford, and Francis Ka-Ming Chan. 2009. "Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation." *Cell* 137 (6). Cell Press: 1112–23. doi:10.1016/J.CELL.2009.05.037.
89. Degterev, Alexei, Junichi Hitomi, Megan Germscheid, Irene L Ch'en, Olga Korkina, Xin Teng, Derek Abbott, et al. 2008. "Identification of RIP1 Kinase as a Specific Cellular Target of Necrostatins." *Nature Chemical Biology* 4 (5). Nature Publishing Group: 313–21. doi:10.1038/nchembio.83.
90. Festjens, N, T Vanden Berghe, S Cornelis, and P Vandenabeele. 2007. "RIP1, a Kinase on the Crossroads of a Cell's Decision to Live or Die." *Cell Death and Differentiation* 14 (3). Nature Publishing Group: 400–410. doi:10.1038/sj.cdd.4402085.
91. He, Sudan, Lai Wang, Lin Miao, Tao Wang, Fenghe Du, Liping Zhao, and Xiaodong Wang. 2009. "Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α ." *Cell* 137 (6). Cell Press: 1100–1111. doi:10.1016/J.CELL.2009.05.021.
92. Zhang, Duan-Wu, Jing Shao, Juan Lin, Na Zhang, Bao-Ju Lu, Sheng-Cai Lin, Meng-Qiu Dong, and Jiahuai Han. 2009. "RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis." *Science (New York, N.Y.)* 325 (5938). American Association for the Advancement of Science: 332–36. doi:10.1126/science.1172308.
93. Micheau, Olivier, and Jürg Tschopp. 2003. "Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes." *Cell* 114 (2). Cell Press: 181–90. doi:10.1016/S0092-8674(03)00521-X.
94. Bonnet, Marion C, Daniela Preukschat, Patrick-Simon Welz, Geert van Loo, Maria A. Ermolaeva, Wilhelm Bloch, Ingo Haase, and Manolis Pasparakis. 2011. "The Adaptor Protein FADD Protects Epidermal Keratinocytes from Necroptosis In Vivo and Prevents Skin Inflammation." *Immunity* 35 (4). Cell Press: 572–82. doi:10.1016/J.IMMUNI.2011.08.014.
95. Lin, Y, A Devin, Y Rodriguez, and Z G Liu. 1999. "Cleavage of the Death Domain Kinase RIP by Caspase-8 Prompts TNF-Induced Apoptosis."

- Genes & Development 13 (19). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2514–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521396>.
96. Cookson, Brad T, and Molly A Brennan. 2001. "Pro-Inflammatory Programmed Cell Death." *Trends in Microbiology* 9 (3). Elsevier Current Trends: 113–14. doi:10.1016/S0966-842X(00)01936-3.
 97. Brennan, Molly A, and Brad T. Cookson. 2000. "Salmonella Induces Macrophage Death by Caspase-1-Dependent Necrosis." *Molecular Microbiology* 38 (1). Wiley/Blackwell (10.1111): 31–40. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02103.x.
 98. Jesenberger, V, K J Procyk, J Yuan, S Reipert, and M Baccharini. 2000. "Salmonella-Induced Caspase-2 Activation in Macrophages: A Novel Mechanism in Pathogen-Mediated Apoptosis." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (7). The Rockefeller University Press: 1035–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015444>.
 99. Fernandes-Alnemri, T, J Wu, J-W Yu, P Datta, B Miller, W Jankowski, S Rosenberg, J Zhang, and E S Alnemri. 2007. "The Pyroptosome: A Supramolecular Assembly of ASC Dimers Mediating Inflammatory Cell Death via Caspase-1 Activation." *Cell Death and Differentiation* 14 (9). NIH Public Access: 1590–1604. doi:10.1038/sj.cdd.4402194.
 100. Sakahira, Hideki, Masato Enari, and Shigekazu Nagata. 1998. "Cleavage of CAD Inhibitor in CAD Activation and DNA Degradation during Apoptosis." *Nature* 391 (6662). Nature Publishing Group: 96–99. doi:10.1038/34214.
 101. Green, Douglas R, and Guido Kroemer. 2004. "The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5684). American Association for the Advancement of Science: 626–29. doi:10.1126/science.1099320.
 102. Miao, Edward A, Jayant V Rajan, and Alan Aderem. 2011. "Caspase-1-Induced Pyroptotic Cell Death." *Immunological Reviews* 243 (1). NIH Public Access: 206–14. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x.
 103. Cederlund, Andreas, Gudmundur H. Gudmundsson, and Birgitta Agerberth. 2011. "Antimicrobial Peptides Important in Innate Immunity." *FEBS Journal* 278 (20). Wiley/Blackwell (10.1111): 3942–51. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08302.x.
 104. Guaní-Guerra, Eduardo, Teresa Santos-Mendoza, Saúl O. Lugo-Reyes, and Luis M. Terán. 2010. "Antimicrobial Peptides: General Overview and Clinical Implications in Human Health and Disease." *Clinical Immunology* 135 (1). Academic Press: 1–11. doi:10.1016/J.CLIM.2009.12.004.
 105. Hancock, Robert E W. 2001. "Cationic Peptides: Effectors in Innate Immunity and Novel Antimicrobials." *The Lancet Infectious Diseases* 1 (3). Elsevier: 156–64. doi:10.1016/S1473-3099(01)00092-5.
 106. Pushpanathan, Muthuirulan, Paramasamy Gunasekaran, and Jeyaprakash Rajendhran. 2013. "Antimicrobial Peptides: Versatile

- Biological Properties.” *International Journal of Peptides* 2013. Hindawi Limited: 675391. doi:10.1155/2013/675391.
107. Jenssen, Harvar. 2009. “Clinical development of peptide antibiotics”. *PharmaChem*.10: 22-23.
 108. Sengupta, Durba, Hari Leontiadou, Alan E. Mark, and Siewert-Jan Marrink. 2008. “Toroidal Pores Formed by Antimicrobial Peptides Show Significant Disorder.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (10). Elsevier: 2308–17. doi:10.1016/J.BBAMEM.2008.06.007.
 109. Madani, Fatemeh, Staffan Lindberg, Ulo Langel, Shiroh Futaki, and Astrid Gräslund. 2011. “Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides.” *Journal of Biophysics (Hindawi Publishing Corporation: Online)* 2011. Hindawi Limited: 414729. doi:10.1155/2011/414729.
 110. Brogden, Kim A. 2005. “Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria?” *Nature Reviews Microbiology* 3 (3). Nature Publishing Group: 238–50. doi:10.1038/nrmicro1098.
 111. Zhuravel, E, T Shestakova, O Efanova, Yu Yusefovich, D Lytvin, M Soldatkina, and P Pogrebnoy. 2011. “Human Beta-Defensin-2 Controls Cell Cycle in Malignant Epithelial Cells: In Vitro Study.” *Experimental Oncology* 33 (3): 114–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956461>.
 112. Shai, Yechiel. 2002. “From Innate Immunity to de-Novo Designed Antimicrobial Peptides.” *Current Pharmaceutical Design* 8 (9): 715–25. doi:10.2174/1381612023395367.
 113. Wu, Dongdong, Yanfeng Gao, Yuanming Qi, Lixiang Chen, Yuanfang Ma, and Yanzhang Li. 2014. “Peptide-Based Cancer Therapy: Opportunity and Challenge.” *Cancer Letters* 351 (1). Elsevier: 13–22. doi:10.1016/J.CANLET.2014.05.002.
 114. Zhuravel, E, T Shestakova, O Efanova, Yu Yusefovich, D Lytvin, M Soldatkina, and P Pogrebnoy. 2011. “Human Beta-Defensin-2 Controls Cell Cycle in Malignant Epithelial Cells: In Vitro Study.” *Experimental Oncology* 33 (3): 114–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956461>.
 115. Shai, Yechiel. 2002. “From Innate Immunity to de-Novo Designed Antimicrobial Peptides.” *Current Pharmaceutical Design* 8 (9): 715–25. doi:10.2174/1381612023395367.
 116. Gaspar, Diana, A Salomé Veiga, and Miguel A R B Castanho. 2013. “From Antimicrobial to Anticancer Peptides. A Review.” *Frontiers in Microbiology* 4 (October). Frontiers Media SA: 294. doi:10.3389/fmicb.2013.00294.
 117. Swithenbank, Lucy, and Claire Morgan. 2017. “The Role of Antimicrobial Peptides in Lung Cancer Therapy.” doi:10.4172/2472-1212.1000134.

118. Zoggel, Hanneke van, Yamina Hamma-Kourbali, Cécile Galanth, Ali Ladram, Pierre Nicolas, José Courty, Mohamed Amiche, and Jean Delbé. 2012. "Antitumor and Angiostatic Peptides from Frog Skin Secretions." *Amino Acids* 42 (1). Springer Vienna: 385–95. doi:10.1007/s00726-010-0815-9.
119. Wang, Kai-rong, Bang-zhi Zhang, Wei Zhang, Jie-xi Yan, Jia Li, and Rui Wang. 2008. "Antitumor Effects, Cell Selectivity and Structure–activity Relationship of a Novel Antimicrobial Peptide Polybia-MPI." *Peptides* 29 (6). Elsevier: 963–68. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2008.01.015.
120. Ren, Shun X, Shen Jin, Cheng Alfred S L, Lu Lan, Chan Ruby L Y, Li Zhi J, Wang Xiao J, Wong Clover C M, Zhang Lin, Ng Simon S M, Chan Franky L, Chan Francis K L, Yu Jun, Sung Joseph J Y, Wu William K K, and Cho, Chi H. 2013. "FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells." Edited by Daotai Nie. *PLoS ONE* 8 (5). Public Library of Science: e63641. doi:10.1371/journal.pone.0063641.
121. Rodrigues, Elaine G, Dobroff Andrey Ss, Cavarsan Clarissa F, Paschoalin Thaysa, Nimrichter Leonardo, Mortara Renato A, Santos Edson Lucas, Fázio Marcos A, Miranda Antonio, Daffre Sirlei, and Travassos Luiz R. 2008. "Effective Topical Treatment of Subcutaneous Murine B16F10-Nex2 Melanoma by the Antimicrobial Peptide Gomesin." *Neoplasia* (New York, N.Y.) 10 (1). Neoplasia Press: 61–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18231639>.
122. Schröder-Borm, Hannah, Rumiana Bakalova, and Jörg Andrä. 2005. "The NK-Lysin Derived Peptide NK-2 Preferentially Kills Cancer Cells with Increased Surface Levels of Negatively Charged Phosphatidylserine." *FEBS Letters* 579 (27). Wiley-Blackwell: 6128–34. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.084.
123. Furlong, Suzanne J, Neale D. Ridgway, and David W. Hoskin. 2008. "Modulation of Ceramide Metabolism in T-Leukemia Cell Lines Potentiates Apoptosis Induced by the Cationic Antimicrobial Peptide Bovine Lactoferricin." *International Journal of Oncology*.
124. Srisailam, S, A.I. Arunkumar, W. Wang, C. Yu, and H.M. Chen. 2000. "Conformational Study of a Custom Antibacterial Peptide Cecropin B1: Implications of the Lytic Activity." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1479 (1-2). Elsevier: 275–85. doi:10.1016/S0167-4838(00)00008-X.
125. Baxter, Amy A, Ivan Kh Poon, and Mark D Hulett. 2017. "The Plant Defensin NaD1 Induces Tumor Cell Death via a Non-Apoptotic, Membranolytic Process." *Cell Death Discovery* 3. Nature Publishing Group: 16102. doi:10.1038/cddiscovery.2016.102.

126. Poon, Ivan KH, Amy A Baxter, Fung T Lay, Grant D Mills, Christopher G Adda, Jennifer AE Payne, Thanh Kha Phan, et al. 2014. "Phosphoinositide-Mediated Oligomerization of a Defensin Induces Cell Lysis." *eLife* 3 (April). eLife Sciences Publications Limited: e01808. doi:10.7554/eLife.01808.
127. Flores-Alvarez, Luis José, Jaquelina Julia Guzmán-Rodríguez, Rodolfo López-Gómez, Rafael Salgado-Garciglia, Alejandra Ochoa-Zarzosa, and Joel E. López-Meza. 2018. "PaDef Defensin from Avocado (*Persea Americana* Var. *Drymifolia*) Is Cytotoxic to K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells through Extrinsic Apoptosis." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 99 (June). Pergamon: 10–18. doi:10.1016/J.BIOCEL.2018.03.013.
128. Guzmán-Rodríguez, Jaquelina Julia, Rodolfo López-Gómez, Rafael Salgado-Garciglia, Alejandra Ochoa-Zarzosa, and Joel E. López-Meza. 2016. "The Defensin from Avocado (*Persea Americana* Var. *Drymifolia*) PaDef Induces Apoptosis in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 82 (August). Elsevier Masson: 620–27. doi:10.1016/J.BIOPHA.2016.05.048.
129. Franco, Octavio Luiz. 2011. "Peptide Promiscuity: An Evolutionary Concept for Plant Defense." *FEBS Letters* 585 (7). Wiley-Blackwell: 995–1000. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.008.
130. Maróti, Gergely, Attila Kereszt, Éva Kondorosi, and Peter Mergaert. 2011. "Natural Roles of Antimicrobial Peptides in Microbes, Plants and Animals." *Research in Microbiology* 162 (4). Elsevier Masson: 363–74. doi:10.1016/J.RESMIC.2011.02.005.
131. Nawrot, Robert, Jakub Barylski, Grzegorz Nowicki, Justyna Broniarczyk, Waldemar Buchwald, and Anna Goździcka-Józefiak. 2014. "Plant Antimicrobial Peptides." *Folia Microbiologica* 59 (3). Springer: 181–96. doi:10.1007/s12223-013-0280-4.
132. Ngai, P.H.K, and T.B Ng. 2004. "A Napin-like Polypeptide from Dwarf Chinese White Cabbage Seeds with Translation-Inhibitory, Trypsin-Inhibitory, and Antibacterial Activities." *Peptides* 25 (2). Elsevier: 171–76. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2003.12.012.
133. Mirouze, Marie, Sels Jan, Richard Odile, Czernic Pierre, Loubet Stéphanie, Jacquier Amaury, François Isabelle E.J.A, Cammue Bruno P.A, Lebrun Michel, Berthomieu Pierre, and Marquès Laurence. 2006. "A Putative Novel Role for Plant Defensins: A Defensin from the Zinc Hyper-Accumulating Plant, *Arabidopsis Halleri*, Confers Zinc Tolerance." *The Plant Journal* 47 (3). Wiley/Blackwell (10.1111): 329–42. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02788.x.
134. Koike, Michiya, Takashi Okamoto, Sakae Tsuda, and Ryoza Imai. 2002. "A Novel Plant Defensin-like Gene of Winter Wheat Is Specifically Induced during Cold Acclimation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298 (1). Academic Press: 46–53.

doi:10.1016/S0006-291X(02)02391-4.

135. Allen, Aron, Anita K. Snyder, Mary Preuss, Erik E. Nielsen, Dilip M. Shah, and Thomas J. Smith. 2007. "Plant Defensins and Virally Encoded Fungal Toxin KP4 Inhibit Plant Root Growth." *Planta* 227 (2). Springer-Verlag: 331–39. doi:10.1007/s00425-007-0620-1
136. Silverstein, Kevin A.T., William A. Moskal, Hank C. Wu, Beverly A. Underwood, Michelle A. Graham, Christopher D. Town, and Kathryn A. VandenBosch. 2007. "Small Cysteine-Rich Peptides Resembling Antimicrobial Peptides Have Been under-Predicted in Plants." *The Plant Journal* 51 (2). Wiley/Blackwell (10.1111): 262–80. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x.
137. G. Wang, Guangshun, Xia Li, and Zhe Wang. 2009. "APD2: The Updated Antimicrobial Peptide Database and Its Application in Peptide Design." *Nucleic Acids Research* 37 (suppl_1): D933–37. doi:10.1093/nar/gkn823.
138. Hammami, R., J. Ben Hamida, G. Vergoten, and I. Fliss. 2009. "PhytAMP: A Database Dedicated to Antimicrobial Plant Peptides." *Nucleic Acids Research* 37 (Database): D963–68. doi:10.1093/nar/gkn655.
139. Barbosa Pelegrini, Patrícia, Rafael Perseghini Del Sarto, Osmar Nascimento Silva, Octávio Luiz Franco, and Maria Fátima Grossi-de-Sa. 2011. "Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work." *Biochemistry Research International* 2011 (March). Hindawi: 250349. doi:10.1155/2011/250349.
140. Tam, James P, Shujing Wang, Ka H Wong, and Wei Liang Tan. 2015. "Antimicrobial Peptides from Plants." *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland) 8 (4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI): 711–57. doi:10.3390/ph8040711.
141. Majewski, Jaroslaw, and Boguslaw Stec. 2010. "X-Ray Scattering Studies of Model Lipid Membrane Interacting with Purothionin Provide Support for a Previously Proposed Mechanism of Membrane Lysis." *European Biophysics Journal* 39 (8). Springer-Verlag: 1155–65. doi:10.1007/s00249-009-0568-0.
142. Fernandez de Caleyra, R, B Gonzalez-Pascual, F García-Olmedo, and P Carbonero. 1972. "Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins in Vitro." *Applied Microbiology* 23 (5). American Society for Microbiology (ASM): 998–1000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5031563>.
143. Florack, D. E. A, and W. J. Stiekema. 1994. "Thionins: Properties, Possible Biological Roles and Mechanisms of Action." *Plant Molecular Biology* 26 (1). Kluwer Academic Publishers: 25–37. doi:10.1007/BF00039517.
144. Bohlmann, H, and K Apel. 1991. "Thionins." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42 (1). Annual

- Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA : 227–40. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.001303.
145. Stec, B. 2006. “Plant Thionins – the Structural Perspective.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (12). Birkhäuser-Verlag: 1370–85. doi:10.1007/s00018-005-5574-5.
146. Ponz, F, J Paz-Ares, C Hernández-Lucas, P Carbonero, and F García-Olmedo. 1983. “Synthesis and Processing of Thionin Precursors in Developing Endosperm from Barley (*Hordeum Vulgare* L.)” *The EMBO Journal* 2 (7). European Molecular Biology Organization: 1035–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453465>.
147. Steinmuller, Klaus, Alfred Batschauer, and Klaus Apel. 1986. “Tissue-Specific and Light-Dependent Changes of Chromatin Organization in Barley (*Hordeum Vulgare*)” *European Journal of Biochemistry* 158 (3). Wiley/Blackwell (10.1111): 519–25. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09785.x.
148. Gausing, K. 1987. “Thionin Genes Specifically Expressed in Barley Leaves.” *Planta* 171 (2): 241–46. doi:10.1007/BF00391100.
149. Ebrahim-Nesbat, Firous, Susanna Behnke, Andris Kleinhofs, and Klaus Apel. 1989. “Cultivar-Related Differences in the Distribution of Cell-Wall-Bound Thionins in Compatible and Incompatible Interactions between Barley and Powdery Mildew.” *Planta* 179 (2): 203–10. doi:10.1007/BF00393690.
150. Evans, J, Y D Wang, K P Shaw, and L P Vernon. 1989. “Cellular Responses to *Pyricularia* Thionin Are Mediated by Ca²⁺ Influx and Phospholipase A2 Activation and Are Inhibited by Thionin Tyrosine Iodination.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (15). National Academy of Sciences: 5849–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2503825>.
151. Kong, Jing-lin, Xiu-bao Du, Chong-xu Fan, Jian-fu Xu, and Xiao-jun Zheng. 2004. “Determination of Primary Structure of a Novel Peptide from Mistletoe and Its Antitumor Activity.” *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica* 39 (10): 813–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15700822>.
152. Li, Shi-Sheng, Joachim Gullbo, Petra Lindholm, Rolf Larsson, Eva Thunberg, Gunnar Samuelsson, Lars Bohlin, and Per Claeson. 2002. “Ligatoxin B, a New Cytotoxic Protein with a Novel Helix-Turn-Helix DNA-Binding Domain from the Mistletoe *Phoradendron Liga*.” *The Biochemical Journal* 366 (Pt 2). Portland Press Ltd: 405–13. doi:10.1042/BJ20020221.
153. Johansson, S, J Gullbo, P Lindholm, B Ek, E Thunberg, G Samuelsson, R Larsson, L Bohlin, and P Claeson. 2003. “Small, Novel Proteins from the Mistletoe *Phoradendron Tomentosum* Exhibit Highly Selective Cytotoxicity to Human Breast Cancer Cells.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 60 (1): 165–75.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12613665>.

154. Loeza-Ángeles, Heber, Eduardo Sagrero-Cisneros, Leticia Lara-Zárate, Erik Villagómez-Gómez, Joel E. López-Meza, and Alejandra Ochoa-Zarzosa. 2008. "Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis Thaliana* Expressed in Endothelial Cells Shows Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activity." *Biotechnology Letters* 30 (10). Springer Netherlands: 1713–19. doi:10.1007/s10529-008-9756-8.
155. Terras, F R, K Eggermont, V Kovaleva, N V Raikhel, R W Osborn, A Kester, S B Rees, S Torrekens, F Van Leuven, and J Vanderleyden. 1995. "Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish: Their Role in Host Defense." *The Plant Cell* 7 (5). American Society of Plant Biologists: 573–88. doi:10.1105/TPC.7.5.573.
156. Park, Hyeong Cheol, Hwan Kang Yun, Jin Chun Hyun, Choon Koo Ja, Hwa Cheong Yong, Young Kim Cha, Chul Kim Min, Sik Chung Woo, Cheol Kim Jong, Hyuk Yoo Jae, Duck Koo Yoon, Chul Koo Sung, Oh Lim Chae, Yeol Lee Sang, and Je Cho, Moo. 2002. "Characterization of a Stamen-Specific cDNA Encoding a Novel Plant Defensin in Chinese Cabbage." *Plant Molecular Biology* 50 (1): 59–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12139009>.
157. Milligan, S B, and C S Gasser. 1995. "Nature and Regulation of Pistil-Expressed Genes in Tomato." *Plant Molecular Biology* 28 (4): 691–711. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647301>.
158. Lay, Fung T, Filippa Brugliera, and Marilyn A Anderson. 2003. "Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and *Petunia*." *Plant Physiology* 131 (3). American Society of Plant Biologists: 1283–93. doi:10.1104/pp.102.016626.
159. Sharma, P, and A Lönneborg. 1996. "Isolation and Characterization of a cDNA Encoding a Plant Defensin-like Protein from Roots of Norway Spruce." *Plant Molecular Biology* 31 (3): 707–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790304>.
160. Pelegri, Patrícia B., and Octávio L. Franco. 2005. "Plant γ -Thionins: Novel Insights on the Mechanism of Action of a Multi-Functional Class of Defense Proteins." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (11). Pergamon: 2239–53. doi:10.1016/J.BIOCEL.2005.06.011.
161. Meneguetti, Beatriz T, Leandro Dos Santos Machado, Karen G N Oshiro, Micaella L Nogueira, Cristiano M E Carvalho, and Octávio L Franco. 2016. "Antimicrobial Peptides from Fruits and Their Potential Use as Biotechnological Tools-A Review and Outlook." *Frontiers in Microbiology* 7. Frontiers Media SA: 2136. doi:10.3389/fmicb.2016.02136.
162. Tam, James P, Shujing Wang, Ka H Wong, and Wei Liang Tan. 2015. "Antimicrobial Peptides from Plants." *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 8 (4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI):

- 711–57. doi:10.3390/ph8040711.
163. Wong, Jack Ho, and Tzi Bun Ng. 2005a. "Sesquin, a Potent Defensin-like Antimicrobial Peptide from Ground Beans with Inhibitory Activities toward Tumor Cells and HIV-1 Reverse Transcriptase." *Peptides* 26 (7). Elsevier: 1120–26. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2005.01.003.
164. Wong, Jack H, and T. B. Ng. 2006. "Limenin, a Defensin-like Peptide with Multiple Exploitable Activities from Shelf Beans." *Journal of Peptide Science* 12 (5): 341–46. doi:10.1002/psc.732.
165. Wong, Jack H, and T.B Ng. 2003. "Gymnin, a Potent Defensin-like Antifungal Peptide from the Yunnan Bean (*Gymnocladus Chinensis* Baill)." *Peptides* 24 (7). Elsevier: 963–68. doi:10.1016/S0196-9781(03)00192-X
166. Wong, Jack H, and T. B. Ng. 2005. "Lunatusin, a Trypsin-Stable Antimicrobial Peptide from Lima Beans (*Phaseolus Lunatus* L.)." *Peptides* 26 (11). Elsevier: 2086–92. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2005.03.004.
167. Wong, Jack Ho, Xiao Qing Zhang, He Xiang Wang, and Tzi Bun Ng. 2006. "A Mitogenic Defensin from White Cloud Beans (*Phaseolus Vulgaris*)." *Peptides* 27 (9). Elsevier: 2075–81. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2006.03.020.
168. Ngai, Patrick H.K, and T.B. Ng. 2004. "Coccinin, an Antifungal Peptide with Antiproliferative and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Large Scarlet Runner Beans." *Peptides* 25 (12). Elsevier: 2063–68. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2004.08.003.
169. Ngai, Patrick H.K, and T B Ng. 2005. "Phaseococcin, an Antifungal Protein with Antiproliferative and Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase Activities from Small Scarlet Runner Beans." *Biochemistry and Cell Biology* 83 (2). NRC Research Press Ottawa, Canada : 212–20. doi:10.1139/o05-037.
170. Anaya-López, José L, Joel E. López-Meza, Victor M. Baizabal-Aguirre, Horacio Cano-Camacho, and Alejandra Ochoa-Zarzosa. 2006. "Fungicidal and Cytotoxic Activity of a *Capsicum Chinense* Defensin Expressed by Endothelial Cells." *Biotechnology Letters* 28 (14). Springer Netherlands: 1101–8. doi:10.1007/s10529-006-9060-4.
171. Lin, Peng, Jack Ho Wong, and Tzi Bun Ng. 2009. "A Defensin with Highly Potent Antipathogenic Activities from the Seeds of Purple Pole Bean." *Bioscience Reports* 30 (2). Portland Press Limited: 101–9. doi:10.1042/BSR20090004.
172. Wang, Conan K, Hu Shu-Hong, Martin Jennifer L, Sjögren Tove, Hajdu Janos, Bohlin Lars, Claeson Per, Göransson Ulf, Rosengren K Johan, Tang Jun, Tan Ning-Hua, and Craik David J. 2009. "Combined X-Ray and NMR Analysis of the Stability of the Cyclotide Cystine Knot Fold That Underpins Its Insecticidal Activity and Potential Use as a Drug

- Scaffold.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (16). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 10672–83. doi:10.1074/jbc.M900021200.
173. Henriques, Sónia Troeira, and David J. Craik. 2010. “Cyclotides as Templates in Drug Design.” *Drug Discovery Today* 15 (1-2). Elsevier Current Trends: 57–64. doi:10.1016/J.DRUDIS.2009.10.007.
174. Craik, David J, and David J. 2012. “Host-Defense Activities of Cyclotides.” *Toxins* 4 (2). Molecular Diversity Preservation International: 139–56. doi:10.3390/toxins4020139.
175. Rosengren, K Johan, Norelle L Daly, Manuel R Plan, Clement Waive, and David J Craik. 2003. “Twists, Knots, and Rings in Proteins. Structural Definition of the Cyclotide Framework.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (10). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 8606–16. doi:10.1074/jbc.M211147200.
176. Svängård, Erika, Robert Burman, Sunithi Gunasekera, Henrik Lövborg, Joachim Gullbo, and Ulf Göransson. 2007. “Mechanism of Action of Cytotoxic Cyclotides: Cycloviolacin O2 Disrupts Lipid Membranes.” *Journal of Natural Products* 70 (4): 643–47. doi:10.1021/np070007v.
177. He, Wenjun, Lai Yue Chan, Guangzhi Zeng, Norelle L. Daly, David J. Craik, and Ninghua Tan. 2011. “Isolation and Characterization of Cytotoxic Cyclotides from *Viola Philippica*.” *Peptides* 32 (8). Elsevier: 1719–23. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2011.06.016.
178. Silvia Romagnoli, Federico Fogolari, Maddalena Catalano, Lucia Zetta, Gerhard Schaller, Konrad Urech, Matteo Giannattasio, Laura Ragona, and Henriette Molinari. 2003. “NMR Solution Structure of Viscotoxin C1 from *Viscum Album* Species *Coloratum* Ohwi: Toward a Structure–Function Analysis of Viscotoxins.” *American Chemical Society* . doi:10.1021/BI034762T.
179. Hughes, P, E Dennis, M Whitecross, D Llewellyn, and P Gage. 2000. “The Cytotoxic Plant Protein, Beta-Purothionin, Forms Ion Channels in Lipid Membranes.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 823–27. doi:10.1074/JBC.275.2.823.
180. Wong, Jack Ho, and Tzi Bun Ng. 2005. “Sesquin, a Potent Defensin-like Antimicrobial Peptide from Ground Beans with Inhibitory Activities toward Tumor Cells and HIV-1 Reverse Transcriptase.” *Peptides* 26 (7). Elsevier: 1120–26. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2005.01.003.
181. Wong, Jack H, and T. B. Ng. 2006. “Limenin, a Defensin-like Peptide with Multiple Exploitable Activities from Shelf Beans.” *Journal of Peptide Science* 12 (5): 341–46. doi:10.1002/psc.732.
182. Wong, Jack H, and T. B. Ng. 2005. “Lunatusin, a Trypsin-Stable Antimicrobial Peptide from Lima Beans (*Phaseolus Lunatus* L.)”

- Peptides 26 (11). Elsevier: 2086–92.
doi:10.1016/J.PEPTIDES.2005.03.004.
183. Lin, Peng, Jack Ho Wong, and Tzi Bun Ng. 2009. “A Defensin with Highly Potent Antipathogenic Activities from the Seeds of Purple Pole Bean.” *Bioscience Reports* 30 (2). Portland Press Limited: 101–9. doi:10.1042/BSR20090004.
184. Ngai, Patrick H.K., and T.B. Ng. 2004. “Coccinin, an Antifungal Peptide with Antiproliferative and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Large Scarlet Runner Beans.” *Peptides* 25 (12). Elsevier: 2063–68. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2004.08.003.
185. Ngai, Patrick H.K, and T B Ng. 2005. “Phaseococcin, an Antifungal Protein with Antiproliferative and Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase Activities from Small Scarlet Runner Beans.” *Biochemistry and Cell Biology* 83 (2). NRC Research Press Ottawa, Canada: 212–20. doi:10.1139/o05-037.
186. Anaya-López, José L, Joel E. López-Meza, Victor M. Baizabal-Aguirre, Horacio Cano-Camacho, and Alejandra Ochoa-Zarzosa. 2006. “Fungicidal and Cytotoxic Activity of a Capsicum Chinense Defensin Expressed by Endothelial Cells.” *Biotechnology Letters* 28 (14). Springer Netherlands: 1101–8. doi:10.1007/s10529-006-9060-4.
187. Baxter, Amy A, Richter Viviane, Lay Fung T, Poon Ivan K H, Adda Christopher G, Vener Prem K, Phan Thanh Kha, Bleackley Mark R, Anderson Marilyn A, Kvensakul Marc, and Hulett Mark D. 2015. “The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis.” *Molecular and Cellular Biology* 35 (11). American Society for Microbiology (ASM): 1964–78. doi:10.1128/MCB.00282-15.
188. Wong, Jack Ho, Xiao Qing Zhang, He Xiang Wang, and Tzi Bun Ng. 2006. “A Mitogenic Defensin from White Cloud Beans (*Phaseolus Vulgaris*).” *Peptides* 27 (9). Elsevier: 2075–81. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2006.03.020.
189. Wong, Jack Ho, and Tzi Bun Ng. 2005. “Vulgarinin, a Broad-Spectrum Antifungal Peptide from Haricot Beans (*Phaseolus Vulgaris*).” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (8). Pergamon: 1626–32. doi:10.1016/J.BIOCEL.2005.02.022.
190. Ma, D.Z., H.X. Wang, and T.B. Ng. 2009. “A Peptide with Potent Antifungal and Antiproliferative Activities from Nepalese Large Red Beans.” *Peptides* 30 (12). Elsevier: 2089–94. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2009.08.017.
191. Wong, Jack H, and T.B Ng. 2003. “Gymnin, a Potent Defensin-like Antifungal Peptide from the Yunnan Bean (*Gymnocladus Chinensis* Baill).” *Peptides* 24 (7). Elsevier: 963–68. doi:10.1016/S0196-9781(03)00192-X.
192. Vriens, Kim, Steve Peigneur, Barbara De Coninck, Jan Tytgat,

- Bruno P A Cammue, and Karin Thevissen. 2016. "The Antifungal Plant Defensin AtPDF2.3 from *Arabidopsis Thaliana* Blocks Potassium Channels." *Scientific Reports* 6. Nature Publishing Group: 32121. doi:10.1038/srep32121.
193. Ji, Yanbin, Subhabrata Majumder, Melissa Millard, Radhika Borra, Tao Bi, Ahmed Y. Elnagar, Nouri Neamati, Alexander Shekhtman, and Julio A. Camarero. 2013. "In Vivo Activation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by an Engineered Cyclotide." *Journal of the American Chemical Society* 135 (31). American Chemical Society: 11623–33. doi:10.1021/ja405108p.
194. Chan, Lai Yue, David J Craik, and Norelle L Daly. 2016. "Dual-Targeting Anti-Angiogenic Cyclic Peptides as Potential Drug Leads for Cancer Therapy." *Scientific Reports* 6. Nature Publishing Group: 35347. doi:10.1038/srep35347.
195. Ding, Xiangmin, Dousheng Bai, and Jianjun Qian. 2014. "Novel Cyclotides from *Hedyotis Biflora* Inhibit Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer Cell in Vitro and in Vivo." *Medicinal Chemistry Research* 23 (3). Springer US: 1406–13. doi:10.1007/s00044-013-0746-6.
196. Nguyen, Giang Kien Truc, Sen Zhang, Ngan Thi Kim Nguyen, Phuong Quoc Thuc Nguyen, Ming Sheau Chiu, Antony Hardjojo, and James P Tam. 2011. "Discovery and Characterization of Novel Cyclotides Originated from Chimeric Precursors Consisting of Albumin-1 Chain a and Cyclotide Domains in the Fabaceae Family." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (27). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 24275–87. doi:10.1074/jbc.M111.229922.
197. Herrmann, Anders, Robert Burman, Joshua S. Mylne, Gustav Karlsson, Joachim Gullbo, David J. Craik, Richard J. Clark, and Ulf Göransson. 2008. "The Alpine Violet, *Viola Biflora*, Is a Rich Source of Cyclotides with Potent Cytotoxicity." *Phytochemistry* 69 (4). Pergamon: 939–52. doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2007.10.023.
198. Burman, Robert, Adam A. Strömstedt, Martin Malmsten, and Ulf Göransson. 2011. "Cyclotide–membrane Interactions: Defining Factors of Membrane Binding, Depletion and Disruption." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (11). Elsevier: 2665–73. doi:10.1016/J.BBAMEM.2011.07.004.
199. Svängård, Erika, Ulf Göransson, Zozan Hocaoglu, Joachim Gullbo, Rolf Larsson, Per Claesson, and Lars Bohlin. 2004. "Cytotoxic Cyclotides from *Viola tricolor* ." *Journal of Natural Products* 67 (2): 144–47. doi:10.1021/np030101l.
200. Hu, Enping, Dongguo Wang, Jiayu Chen, and Xiulin Tao. 2015. "Novel Cyclotides from *Hedyotis Diffusa* Induce Apoptosis and Inhibit Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (3). e-Century

- Publishing Corporation: 4059–65.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064310>.
201. Sen, Zhang, Xiao Kai Zhan, Jin Jing, Zhang Yi, and Zhou Wanqi. 2013. "Chemosensitizing Activities of Cyclotides from *Clitoria Ternatea* in Paclitaxel-Resistant Lung Cancer Cells." *Oncology Letters* 5 (2). Spandidos Publications: 641–44. doi:10.3892/ol.2012.1042.
 202. Development Trends for Peptide Therapeutics: Status in 2016." J.L. Lau and M.K. Dunn, Ferring Research Institute. Citation: Presented at the 11th Annual Peptide Therapeutics Symposium, La Jolla, California, October 27-28, 2016.
 203. Angka, Leonard, Eric A. Lee, Sarah G. Rota, Thomas Hanlon, Mahadeo Sukhai, Mark Minden, Elliott M. McMillan, Joe Quadrilatero, and Paul A. Spagnuolo. 2014. "Glucopsychosine Increases Cytosolic Calcium to Induce Calpain-Mediated Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells." *Cancer Letters* 348 (1-2). Elsevier: 29–37. doi:10.1016/J.CANLET.2014.03.003.
 204. Guzmán-Rodríguez, Jaquelina Julia, Rodolfo López-Gómez, Luis M Suárez-Rodríguez, Rafael Salgado-Garciglia, Luis C Rodríguez-Zapata, Alejandra Ochoa-Zarzosa, and Joel E López-Meza. 2013. "Antibacterial Activity of Defensin PaDef from Avocado Fruit (*Persea Americana* Var. *Drymifolia*) Expressed in Endothelial Cells against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*." *BioMed Research International* 2013. Hindawi Limited: 986273. doi:10.1155/2013/986273
 205. Organización Mundial de la salud (2017) Cáncer. Nota descriptiva No. 297 . Febrero de 2017. Recuperado de 29 de agosto de 2017, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
 206. Pokharel, Manisha. 2012. "Leukemia : A Review Article." Pokharel. Vol. 2. www.ijarpb.com.
 207. Amaravadi, R. K, and C. B. Thompson. 2007. "The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment." *Clinical Cancer Research* 13 (24): 7271–79. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1595.
 208. Guerriero, Jennifer L, Dara Ditsworth, Yongjun Fan, Fangping Zhao, Howard C Crawford, and Wei-Xing Zong. 2008. "Chemotherapy Induces Tumor Clearance Independent of Apoptosis." *Cancer Research* 68 (23). NIH Public Access: 9595–9600. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2452.
 209. Kaur, Gurvinder, and Jannette M Dufour. 2012. "Cell Lines: Valuable Tools or Useless Artifacts." *Spermatogenesis* 2 (1). Taylor & Francis: 1–5. doi:10.4161/spmg.19885
 210. Vogelstein, Bert, Nickolas Papadopoulos, Victor E Velculescu, Shibin Zhou, Luis A Diaz, Kenneth W Kinzler, and Kenneth W. Kinzler. 2013. "Cancer Genome Landscapes." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6127). NIH Public Access: 1546–58. doi:10.1126/science.1235122.

211. Marqus, Susan, Elena Pirogova, and Terrence J. Piva. 2017. "Evaluation of the Use of Therapeutic Peptides for Cancer Treatment." *Journal of Biomedical Science* 24 (1). BioMed Central: 21. doi:10.1186/s12929-017-0328-x.
212. Mohammad, Ramzi M, Muqbil Irfana, Lowe Leroy, Yedjou Clement, Hsu Hsue-Yin, Lin Liang-Tzung, Siegelin Markus David, Fimognari Carmela, Kumar Nagi B, Dou Q Ping, Yang Huanjie, Samadi Abbas K, Russo Gian Luigi, Spagnuolo Carmela, Ray Swapan K, Chakrabarti Mrinmay, Morre James D, Coley Helen M, Honoki Kanya, Fujii Hiromasa, Georgakilas Alexandros G, Amedei Amedeo, Niccolai Elena, Amin Amr, Ashraf S Salman, Helferich William G, Yang Xujuan, Boosani Chandra S, Guha Gunjan, Bhakta Dipita, Ciriolo Maria Rosa, Aquilano Katia, Chen Sophie, Mohammed Sulma I, Keith W Nicol, Bilsland Alan, Halicka Dorota, Newsheen Somaira, and Azmi Asfar S. 2015. "Broad Targeting of Resistance to Apoptosis in Cancer." *Seminars in Cancer Biology* 35 (December). Academic Press: S78–103. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2015.03.001.
213. Gerl, R., and David L. Vaux. 2004. "Apoptosis in the Development and Treatment of Cancer." *Carcinogenesis* 26 (2). Oxford University Press: 263–70. doi:10.1093/carcin/bgh283.
214. Ferreira, Carlos G, Mirjam Epping, Frank A E Kruyt, and Giuseppe Giaccone. 2002. "Apoptosis: Target of Cancer Therapy." Vol.8, 2024-2034. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/8/7/2024.full.pdf>.
215. Harris, Frederick, Sarah R. Dennison, Jaipaul Singh, and David A. Phoenix. 2013. "On the Selectivity and Efficacy of Defense Peptides with Respect to Cancer Cells." *Medicinal Research Reviews* 33 (1). Wiley-Blackwell: 190–234. doi:10.1002/med.20252.
216. Guzman Rodriguez Jaquelina Julia. (2016). Citotoxicidad de las defensinas PaDef (*Persea americana* var *drymifolia*) y γ -tionina (*Capsicum chinense*) contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Tesis de Doctorado). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
217. Díaz-Murillo, Violeta, Ivan Medina-Estrada, Joel E. López-Meza, and Alejandra Ochoa-Zarzosa. 2016. "Defensin γ -Thionin from *Capsicum Chinense* Has Immunomodulatory Effects on Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus Aureus* Internalization." *Peptides* 78 (April). Elsevier: 109–18. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2016.02.008.
218. Vallabhapurapu, Subrahmanya D., Víctor M. Blanco, Mahaboob K. Sulaiman, Swarajya Lakshmi Vallabhapurapu, Zhengtao Chu, Robert S. Franco, and Xiaoyang Qi. 2015. "Variation in Human Cancer Cell External Phosphatidylserine Is Regulated by Flippase Activity and

- Intracellular Calcium.” *Oncotarget* 6 (33): 34375–88. doi:10.18632/oncotarget.6045.
219. Papo, N., and Y. Shai. 2005. “Host Defense Peptides as New Weapons in Cancer Treatment.” *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (7-8). Birkhäuser-Verlag: 784–90. doi:10.1007/s00018-005-4560-2.
220. Schröder-Borm, Hannah, Rumiana Bakalova, and Jörg Andrä. 2005. “The NK-Lysin Derived Peptide NK-2 Preferentially Kills Cancer Cells with Increased Surface Levels of Negatively Charged Phosphatidylserine.” *FEBS Letters* 579 (27). Wiley-Blackwell: 6128–34. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.084.
221. Aerts, An M., Leen Bammens, Gilmer Govaert, Didac Carmona-Gutierrez, Frank Madeo, Bruno P. A. Cammue, and Karin Thevissen. 2011. “The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera Sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida Albicans*.” *Frontiers in Microbiology* 2 (March). *Frontiers*: 47. doi:10.3389/fmicb.2011.00047.
222. Aerts, An, Didac Carmona-Gutierrez, Sophie Lefevre, Gilmer Govaert, Isabelle E.J.A. François, Frank Madeo, Renata Santos, Bruno P.A. Cammue, and Karin Thevissen. 2009. “The Antifungal Plant Defensin RsAFP2 from Radish Induces Apoptosis in a Metacaspase Independent Way in *Candida Albicans*.” *FEBS Letters* 583 (15). Wiley-Blackwell: 2513–16. doi:10.1016/j.febslet.2009.07.004.
223. Wang, Xia, and Yong Lin. 2008. “Tumor Necrosis Factor and Cancer, Buddies or Foes?” *Acta Pharmacologica Sinica* 29 (11). NIH Public Access: 1275–88. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x.
224. Thomma, Bart, Bruno Cammue, and Karin Thevissen. 2002. “Plant Defensins.” *Planta* 216 (2). Springer-Verlag: 193–202. doi:10.1007/s00425-002-0902-6.
225. Teixeira, Vitor, Maria J. Feio, and Margarida Bastos. 2012. “Role of Lipids in the Interaction of Antimicrobial Peptides with Membranes.” *Progress in Lipid Research* 51 (2). Pergamon: 149–77. doi:10.1016/J.PLIPRES.2011.12.005.