



Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico
Biológicas

**EVALUACIÓN DEL EFECTO
CITOTÓXICO DE LOS
CICLODIPÉPTIDOS DE
Pseudomonas aeruginosa PAO1 EN
MUESTRAS DE PACIENTES CON
LEUCEMIA**

T E S I S

Para obtener el título de
Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Héctor Antonio Kido Díaz

Director de Tesis:

D.C. Homero Reyes de la Cruz

Codirector de Tesis:

D.C. Jesús Campos García



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS
UMSNH

Morelia Michoacán, febrero del 2023.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al D.C. Homero y al D.C. Campos

Todo el trabajo realizado en este ambicioso proyecto fue posible gracias a ustedes. Muchas gracias por todas las enseñanzas, la confianza y por el apoyo incondicional.

Al personal del Hospital Infantil de Morelia

Especialmente al Dr. Eloy y a la Enfermera Elizabeth. Gran parte de esto no hubiera sido posible sin ustedes.

A mis padres, Víctor y Mercedes y hermanos, Vic y Ary

Infinitas gracias por ser mi impulso e inspiración, por enseñarme a nunca rendirme y por creer siempre en mí. Lo que soy ahora es gracias a ustedes. Orgulloso de que sean mi familia y que estén a mi lado en este momento tan importante.

A Kenia

Mi compañera de vida, por siempre brindarme tu amor y tu apoyo incondicional. Eres la motivación para convertirme en el hombre que quiero. Gracias por entenderme en todo, por tantas ayudas y aportes, en mi tesis y en mi vida. Eres mi todo reflejado en una persona.

A Lore

A ti te agradezco tu tiempo, compañía, paciencia, tus consejos y tu guía, sin ellos hoy no estaría aquí. Mil gracias por hacerlo inolvidable y por recordarme que soy un cohetito.

A Lolita

Mi gran amiga, gracias por acompañarme y por un sinfín de acontecimientos que poco tuvieron que ver con lo académico, sino más bien, con la amistad.

Al D.C. César, a mis compañeros y amigos de laboratorio

Gracias por acompañarme y por hacer mejores los días en el laboratorio.

“La educación no consiste en aprender hechos, sino en preparar la mente para pensar”

- Albert Einstein

C O N T E N I D O	
Tema	Página
1. RESUMEN	8
ABSTRACT	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. Generalidades del cáncer	10
2.1.1. Características del cáncer	10
2.2. Leucemia	12
2.2.1. Incidencia del cáncer y de la leucemia en México y el mundo	14
2.2.2. Tratamientos contra la leucemia	15
2.2.3. Enfoque científico para la terapia del cáncer	16
2.3. Mecanismos de muerte celular	17
2.3.1. Necrosis	17
2.3.2. Necroptosis	18
2.3.3. Apoptosis	18
2.3.4. Vía intrínseca o mediada por mitocondrias	19
2.3.5. Vía extrínseca o mediada por receptores	21
3. ANTECEDENTES	21
3.1. Ciclodipéptidos como moléculas con potencial anticancerígeno	21
3.2. Actividades biológicas de los ciclodipéptidos	22
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. HIPÓTESIS	30
6. OBJETIVOS	30
7. MATERIALES Y METODOS	31
7.1. Medio de cultivo	31
7.2. Toma y clasificación de muestras	31
7.3. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	31
7.4. Extracción de la mezcla de CDPs de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	31
7.5. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	32
7.6. Purificación de los CDPs	32
7.7. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	32

7.8.	Aislamiento de células mononucleares por centrifugación diferencial de densidad de componentes sanguíneos	33
7.9.	Identificación de células mononucleares en microscopio óptico mediante tinción Wright	33
7.10.	Ensayo de viabilidad celular por el método colorimétrico de MTT	34
7.11.	Ensayos de apoptosis y necrosis mediante Anexina V y Yoduro de propidio por citometría de flujo	34
7.12.	Ensayo de hemolisis por espectrofotometría	35
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
9.	RESULTADOS	36
9.1.	Extracción y separación de los ciclodipéptidos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	36
9.2.	Aislamiento e identificación de las células mononucleares a partir de muestra de medula ósea y de sangre periférica.	38
9.3.	Las diferentes fracciones obtenidas a partir de la mezcla de ciclodipéptidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 presentan un efecto citotóxico en línea celular de leucemia crónica K5462	38
9.4.	Efecto citotóxico de los ciclodipéptidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sobre las células mononucleares aisladas de los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.	39
9.5.	Los ciclodipéptidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 inducen la apoptosis en células mononucleares aisladas de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.	42
9.6.	Los ciclodipéptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 no presentan efecto citotóxico sobre eritrocitos y plaquetas aislados de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.	44
9.7.	Los ciclodipéptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 no provocan efecto hemolítico en eritrocitos aislados de sangre periférica de individuos sanos	45
9.8.	Los ciclodipéptidos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 poseen efecto citotóxico sobre células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizadas como reincidencia.	46

9.9. Los ciclodipeptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 inducen la apoptosis en células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia.	48
10. DISCUSIÓN	50
11. CONCLUSIÓN	56
12. REFERENCIAS	56
13. ANEXOS	61
13.1. Protocolo de investigación “Efecto de ciclodipeptidos bacterianos en células sanguíneas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda del Hospital Infantil de Morelia”	61
13.2. Artículo “Bacterial cyclodipeptides elicit <i>Arabidopsis thaliana</i> immune responses reducing the pathogenic effects of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 strains on plant development”	62

INDICE DE FIGURAS	
Figura	Pagina
Figura 1. Porcentajes de incidencia de los distintos tipos de cáncer	14
Figura 2. Enfoque terapéutico de los rasgos del cáncer	17
Figura 3. Vías de inducción de apoptosis	20
Figura 4. Estructura general de los ciclodipeptidos o 2,5-diketopiperazinas	22
Figura 5. Efecto de los CDPs sobre líneas celulares HeLa y CaCo-2	24
Figura 6. Efecto de los CDPs sobre líneas celulares de fibroblastos de pulmón humano y células de epitelio mamario bovino	25
Figura 7. Efecto de los CDPs sobre tumores en modelo de melanoma murino	26
Figura 8. Inducción de apoptosis en células HeLa por los ciclodipeptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Figura 9. Efectos de los ciclodipeptidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , implicados en la vía de señalización de mTOR en células HeLa	28
Figura 10. Cromatograma de la mezcla de ciclodipeptidos extraídos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	36
Figura 11. Cromatogramas de las diferentes fracciones obtenidas de CDPs	37
Figura 12. Células mononucleares aisladas	38

Figura 13. Ensayo de viabilidad sobre línea celular K562 con las diferentes fracciones de ciclodipéptidos	39
Figura 14. Ensayo de viabilidad celular de células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda	41
Figura 15. Ensayo de viabilidad celular de células mononucleares aisladas de pacientes considerados sanos	41
Figura 16. Graficas de puntos representativas del ensayo de Anexina V/Ioduro de Propidio para identificar el tipo de muerte celular inducido por los ciclodipéptidos en células mononucleares de pacientes con leucemia linfoblástica aguda	43
Figura 17. Porcentaje de células apoptóticas en células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda por tratamientos de vincristina y ciclodipéptidos	43
Figura 18. Graficas de puntos representativas del ensayo de Anexina V/Ioduro de Propidio para identificar el tipo de muerte celular inducido por los ciclodipéptidos en células mononucleares de individuos sanos	44
Figura 19. Porcentaje de células apoptóticas en las fase eritrocitaria y plaquetaria aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda	45
Figura 20. Porcentaje de hemolisis obtenido en los tratamientos con ciclodipéptidos a 0.01 y 0.05 mg/mL	46
Figura 21. Ensayo de viabilidad celular sobre células cancerosas aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia a 12 horas	47
Figura 22. Ensayo de viabilidad celular sobre células cancerosas aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia a 24 horas	48
Figura 23. Graficas de puntos representativas del ensayo de Anexina V/Ioduro de Propidio para identificar el tipo de muerte celular inducido por los ciclodipéptidos en células mononucleares de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia	49
Figura 24. Porcentaje de células apoptóticas en células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia	50

1. RESUMEN

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial. La introducción de nuevas estrategias de detección temprana y mejoras en la terapia del cáncer han permitido disminuir su incidencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Este progreso ha sido generado por el avance en la investigación de los procesos biológicos que caracterizan esta enfermedad, dichos avances permitirán acelerar la introducción de nuevos fármacos que mejoren el manejo de los pacientes que presentan dicha patología. Los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Phe), ciclo(L-Pro-L-Val), y ciclo(L-Pro-L-Leu) producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PAO1-CDPs), cuyos efectos han sido implicados en la inhibición de la proliferación de líneas celulares cancerosas. Los estudios han demostrado que en la línea cancerosa HeLa, los CDPs inhiben la fosforilación de las proteínas de la vía de señalización PI3k/Akt/mTOR mediante los complejos mTORC1 y mTORC2, de una manera dependiente de la participación del complejo TSC1/TSC2. En el presente trabajo se analizó el efecto de estos compuestos en muestras directas de pacientes con leucemia, con la finalidad de continuar con los estudios preclínicos y establecer si los CDPs tienen un efecto citotóxico en estas células cancerosas a través de la inducción de la apoptosis. Para la evaluación de la viabilidad celular y determinación de tipo de muerte, se utilizaron métodos colorimétricos y tinciones fluorescentes por citometría de flujo, respectivamente, sobre células aisladas. Los resultados obtenidos demuestran que los CDPs presentan citotoxicidad sobre las células cancerosas con una IC₅₀ calculada de 3.2 µg/mL y disminución de la viabilidad celular del 80% después de 12 h de tratamiento. Además, mediante el proceso apoptótico desencadenado, se logró obtener 80% de células apoptóticas después de 4 h de tratamiento. Con respecto a eritrocitos y plaquetas, no se presentó porcentaje de células apoptóticas después de 4 h de tratamiento. Así mismo, el porcentaje de hemólisis obtenido fue de 3%. No obstante, para las células de pacientes categorizados como "reincidencia" se observó ~40% de disminución en la viabilidad celular después de 24 h de tratamiento, así como 11% de células apoptóticas después de 4 h de tratamiento. Se concluyó con este proyecto que los CDPs producen apoptosis y su efecto citotóxico es selectivo, al no afectar el resto de las células sanguíneas de muestras de pacientes con leucemia, así como las de individuos sanos.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, ciclodipéptidos, leucemia, cáncer, apoptosis.

ABSTRACT

Cancer is one of the main pathologies affecting the population worldwide. The introduction of new strategies for early detection and improvements in cancer therapy have made it possible to reduce its incidence and improve the patients' life quality. This progress has been generated by advances in research into the biological processes that characterize this disease, and these advances will accelerate the introduction of new drugs that improve the management of patients with this pathology. This progress has been generated by advances in research into the biological processes that characterize this disease, and these advances will accelerate the introduction of new drugs that improve the management of patients with this pathology. Cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Phe), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Leu) cyclopeptides produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PAO1-CDPs), whose effects have been implicated in the inhibition of the proliferation of cancer cell lines. Studies have shown that in the HeLa cancer line, CDPs inhibit the phosphorylation of PI3k/Akt/mTOR signaling pathway proteins via the mTORC1 and mTORC2 complexes, in a manner dependent on the involvement of the TSC1/TSC2 complex. In this work, the effect of these compounds was analyzed in samples of patients with leukemia, in order to continue with preclinical studies and to establish whether CDPs have a cytotoxic effect on these cancer cells through the induction of apoptosis. For the evaluation of cell viability and determination of death type, colorimetric methods and fluorescent staining by flow cytometry, respectively, were used on isolated cells. The results obtained show that CDPs exhibit cytotoxicity on cancer cells with a calculated IC_{50} of 3.2 $\mu\text{g/mL}$ and a decrease in cell viability of 80% after 4 h of treatment. In addition, through the apoptotic process triggered, 80% of apoptotic cells were obtained after 4 h of treatment. With respect to erythrocytes and platelets, there was no percentage of apoptotic cells after 4 h of treatment. Likewise, the percentage of hemolysis obtained was 3%. However, for cells from patients categorized as "recurrence", a ~40% decrease in cell viability was observed after 24 h of treatment, as well as 11% of apoptotic cells after 4 hours of treatment. We concluded with this project that CDPs produce apoptosis and their cytotoxic effect is selective, by not affecting the rest of the blood cells in samples from leukemia patients, as well as those from healthy individuals.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades del cáncer

"El cáncer" es un término genérico que se refiere a decenas de enfermedades diferentes que afectan a muchos tejidos y tipos celulares (*Hoskin y Ramamoorthy, 2008*). Las teorías actuales definen el cáncer como una proliferación celular descontrolada causada por la acumulación progresiva de mutaciones aleatorias en genes críticos que controlan el crecimiento/diferenciación celular (*Meng et al., 2012*) y en ciertos casos de una reprogramación epigenética (*Saito y Suyama, 2015*). La OMS define el término "Cáncer" como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células (*OMS, 2020*). Otra definición publicada por el Instituto Nacional del Cáncer es: Nombre de las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos (*Hanahan y Weinberg, 2011*). Entonces, "Cáncer" es el término general para referirse a cientos de enfermedades que afectan distintos tipos de tejidos y tipos de células (*Hoskin y Ramamoorthy, 2008*). En determinados padecimientos las células cancerosas se aglomeran en masas de tejido las cuales se denominan tumores, estos complejos de tejidos compuestos por distintos tipos de células que participan en interacciones unas con otras desarrollando un particular microambiente dentro de estos (*Hanahan y Weinberg, 2011*). Si bien muchos tipos de cánceres forman tumores sólidos, los cánceres de la sangre, como las leucemias, no forman tumores sólidos.

Los tumores cancerosos malignos, se pueden extender a los tejidos cercanos o los pueden invadir. Además, al crecer estos tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original.

2.1.1. Características del cáncer

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

El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NIH) explica que los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos principales de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Estos cambios se llaman "causantes" de cáncer (NIH, 2020).

Los proto-oncogenes participan en el crecimiento y división celular normal. Sin embargo, cuando estos genes se alteran en ciertas maneras o son más activos, pueden convertirse en genes causantes de cáncer (oncogenes). Por otro lado, los genes supresores de tumores participan en el control del crecimiento y la división celular. Las células con algunas alteraciones en los genes supresores de tumores pueden dividirse de forma descontrolada (NIH, 2020).

La función de los genes reparadores del ADN se basa en corregir los daños al ADN. Las células con mutaciones en estos genes tienden a acumular mutaciones adicionales en otros genes. Juntas, estas mutaciones pueden causar que las células procedan a convertirse en cancerosas. Hanahan y Weinberg propusieron en 2011 que una célula para denominarse como "célula cancerosa" debe de cumplir con una lista de sellos distintivos. La base de su estudio fue el cambio progresivo de una célula normal a un estado neoplásico y las características que va adquiriendo. Estas características distintivas permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica (Hanahan y Weinberg, 2011).

A pesar de las diversas entidades clínicas agrupadas como cáncer, es posible identificar ciertas características comunes de las células tumorales que permiten el desarrollo de nuevas estrategias clínicas comunes para su manejo (Hanahan y Weinberg, 2011). Existen ocho características que son compartidas por las células tumorales:

1. Independencia de señales de crecimiento.
2. Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento.
3. Invasividad y metástasis.
4. Evasión de apoptosis.
5. Potencial ilimitado de replicación.
6. Angiogénesis sostenida.
7. Reprogramación del metabolismo energético.
8. Evasión de la destrucción inmunológica.

Estas características son adquiridas en los diversos tipos celulares por distintos mecanismos y eventos durante el proceso carcinogénico. Su desarrollo se ve favorecido por la inestabilidad genómica y la inflamación las fomenta (*Hanahan y Weinberg, 2011*).

El sistema inmunológico posee diversos mecanismos que le permiten reconocer y eliminar las células transformadas. Sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor. Por esta razón, en los últimos años las investigaciones se han enfocado al estudio y comprensión de los mecanismos inmunológicos capaces de reconocer y destruir las células tumorales (*Barrera et al., 1995*).

2.2. Leucemia

Leucemia es el nombre general dado a un grupo de cánceres que se desarrollan en la médula ósea en las células madre sanguíneas, las cuales son células básicas que se convierten en células madre linfoides o células madre mieloides, por un lado, las células madre linfoides se convierten en linfocitos, un tipo de glóbulo blanco. Los linfocitos ayudan a combatir infecciones y a destruir células anormales. Los 3 tipos de linfocitos son las células B, las células T y las células asesinas naturales (NK). Por otro lado, las células madre mieloides se convierten en glóbulos rojos, granulocitos, monocitos y plaquetas. Los glóbulos rojos transportan oxígeno a todos los tejidos del cuerpo. Los granulocitos y monocitos son tipos de glóbulos blancos que destruyen las bacterias y ayudan a combatir las infecciones. Las plaquetas forman coágulos en los vasos sanguíneos dañados para detener el sangrado (*Kawata et al., 2018*).

A medida que se desarrollan las células madre de la sangre, se convierten en células blásticas (blastos), que son células sanguíneas inmaduras. En la leucemia, hay una sobreproducción de células blásticas. Estas células blásticas se desarrollan de manera anormal y no se convierten en células sanguíneas maduras. Con el tiempo, las células blásticas desplazan a las células sanguíneas normales y en consecuencia se da la disfunción de las diferentes células sanguíneas (*Stanford Health Care, 2020*).

La leucemia se clasifica según el tipo de glóbulos blancos afectados y la rapidez con que progresa la enfermedad resultando en leucemia linfocítica y leucemia mieloides que pueden ser agudas y crónicas respectivamente. La leucemia aguda progresa rápidamente

y da como resultado la acumulación de células sanguíneas inmaduras y sin función en la médula ósea. Con este tipo de leucemia, las células se reproducen y se acumulan en la médula, disminuyendo la capacidad de la médula para producir suficientes células sanguíneas sanas. La leucemia crónica progresa más lentamente y da como resultado la acumulación de glóbulos blancos relativamente maduros, pero aún anormales (*Bergom et al., 2005*).

La leucemia linfocítica aguda (ALL) progresa rápidamente, reemplazando las células sanas que producen linfocitos funcionales con células leucémicas que no pueden madurar adecuadamente. Las células leucémicas se transportan en el torrente sanguíneo a otros órganos y tejidos, incluidos el cerebro, el hígado, los ganglios linfáticos y los testículos, donde continúan creciendo y dividiéndose (*Kawata et al., 2018*). La leucemia linfocítica crónica (CLL) es un cáncer de crecimiento lento que comienza en los linfocitos de la médula ósea y se extiende hasta la sangre. También puede extenderse a los ganglios linfáticos y órganos como el hígado y el bazo. La CLL se desarrolla cuando crecen demasiados linfocitos anormales, desplazando a las células sanguíneas normales y dificultando que el cuerpo combata las infecciones. La leucemia mieloide aguda (AML), también conocida como leucemia mielógena aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia granulocítica aguda o leucemia no linfocítica aguda, es una forma de cáncer de crecimiento rápido en la sangre y la médula ósea (*Stanford Health Care, 2020*). La leucemia mieloide crónica (LMC), también conocida como leucemia mielógena crónica, comienza en las células formadoras de sangre de la médula ósea y luego, con el tiempo, se propaga a la sangre. Finalmente, la enfermedad se propaga a otras áreas del cuerpo (*Stanford Health Care, 2020*).

La leucemia de células pilosas (HCL) es un subtipo raro de leucemia linfocítica crónica (CLL) que progresa lentamente. El HCL se produce cuando la médula ósea produce demasiadas células B (linfocitos), un tipo de glóbulo blanco que combate las infecciones. A medida que aumenta el número de células leucémicas, se producen menos glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas saludables (*Bergom et al., 2005*).

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo de enfermedades estrechamente relacionadas en las cuales la médula ósea produce muy pocos glóbulos rojos en funcionamiento (que transportan oxígeno), glóbulos blancos (que combaten las infecciones) o plaquetas (que previenen o detienen el sangrado), o cualquier combinación de los tres. Los diferentes tipos de síndromes mielodisplásicos se diagnostican en función de ciertos cambios en las células sanguíneas y la médula ósea. Las células en la sangre y

la médula ósea (también llamada miel) generalmente se ven anormales (o displásicas), de ahí el nombre de síndromes mielodisplásicos (*Kawata et al., 2018*).

Según la Sociedad Americana del Cáncer, alrededor de 13,000 personas al año son diagnosticadas con SMD. En el pasado, el SMD se conocía comúnmente como una condición preleucémica (y a veces todavía se llama preleucemia) porque algunas personas con MDS desarrollan leucemia aguda como complicación de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con SMD nunca desarrollarán leucemia aguda. Por convención, los SMD se reclasifican como leucemia mieloide aguda (LMA) con características mielodisplásicas cuando los blastos de sangre o médula ósea alcanzan o superan el 20 por ciento. Tanto adultos como niños pueden desarrollar leucemia, pero ciertos tipos son más comunes en diferentes grupos de edad. En adultos, la CLL y AML son las leucemias más comunes (*Stanford Health Care, 2020*) (*Kawata et al., 2018*).

2.2.1. Incidencia del cáncer y de la leucemia en México y el mundo

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se ha avanzado potencialmente en el conocimiento del cáncer y algunos de los factores etiológicos que lo predisponen. Por ejemplo, se sabe que la interacción de factores genéticos y estímulos ambientales provoca alteraciones en el interior de las células, que frecuentemente llevan a una proliferación celular anormal.

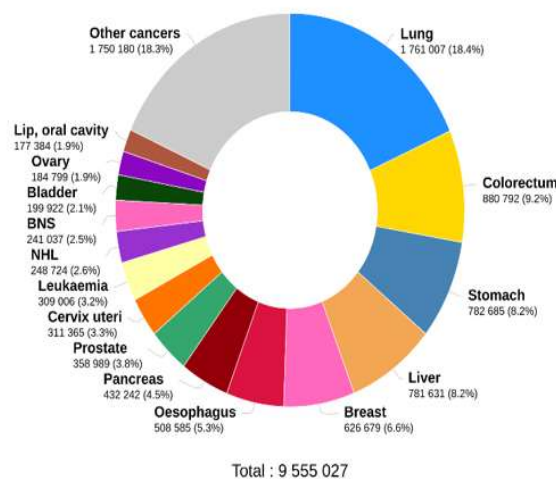


Figura 1. Porcentajes de incidencia de los distintos tipos de cáncer. (*NIH, 2020*)

La leucemia es más frecuente en adultos mayores de 55 años, pero también es el cáncer más común en niños menores de 15 años. La leucemia representa alrededor de una tercera parte de todos los cánceres infantiles (OMS, 2020).

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que en México durante el periodo de 2011 a 2016, aproximadamente el 50 % de las muertes observadas por tumores malignos en la población de 0 a 17 años se debieron a cánceres de órganos hematopoyéticos. Para la población de 18-29 años este tipo de cáncer es el que causa el mayor número de muertes; y para la población de 30-59 años está entre los 5 principales como causa de mortalidad, además de tumores digestivos, cáncer de mama, de órganos genitales femenino y respiratorio. Dentro de los cánceres de órganos hematopoyéticos, por su incidencia, destacan las leucemias (OMS, 2020).

2.2.2. Tratamientos contra la leucemia

El tratamiento depende de la edad, la salud general y tipo de leucemia del paciente. Es posible que se dé una combinación de tratamientos que pueden incluir quimioterapia, terapia biológica, radioterapia y trasplante de células madre. Los pacientes con leucemia aguda a menudo se someten a quimioterapia porque este tipo de tratamiento se dirige a las células de división rápida. Muchos pacientes con leucemia aguda han respondido con éxito al tratamiento. Por otro lado, debido a que las células se dividen más lentamente en la leucemia crónica, se trata mejor con terapias dirigidas que atacan las células que se dividen lentamente en lugar de la quimioterapia tradicional que se dirige a las células que se dividen rápidamente.

La identificación de alteraciones epigenéticas en las leucemias ha motivado a la búsqueda de moléculas capaces de revertir dichas alteraciones. En las últimas décadas se han logrado avances sustanciales en el tratamiento de pacientes con leucemia. La implementación de terapias dirigidas epigenéticamente que se usan en combinación con agentes quimioterapéuticos ha probado mejorar la efectividad de los agentes quimioterapéuticos sobre todo en aquellos pacientes que presentan resistencia al tratamiento, sin embargo la detección de mutaciones asociadas con la quimiorresistencia, las infecciones y los efectos tóxicos del tratamiento (que pueden ser leves, severos o potencialmente mortales), así como la inespecificidad de las terapias epigenéticas señalan

que el principal reto es mejorar la tasa de curación mediante una mejor estratificación del riesgo y la aplicación de terapias dirigidas molecularmente con información epigenética (*Stanford Health Care, 2020*) (*Kawata et al., 2018*).

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

2.2.3. Enfoque científico para la terapia del cáncer

Los avances alcanzados en el entendimiento de las vías de señalización involucradas en el cáncer permiten facilitar la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Por otra parte, ha crecido el desarrollo de perfiles genéticos únicos o múltiples que tienen variadas aplicaciones: en el establecimiento del riesgo de padecer cáncer, en el diagnóstico, pronóstico y terapia. Su uso como test genético a familias afectadas por algunos tipos de tumores (en particular colon, pulmón, mama), ha permitido mejorar significativamente el manejo de los pacientes.

Los resultados generados por la investigación médica básica deben ser complementados por la investigación clínica y epidemiológica solo esto podrá optimizar recursos y obtener mejores resultados para el paciente. Por lo tanto, el desarrollo de la medicina traslacional depende del entendimiento entre estos tres ámbitos de investigación, su confluencia e interacción. La participación de médicos en la investigación básica es cada vez más fundamental para acelerar su desarrollo, así como su enfoque terapéutico (Figura 2).

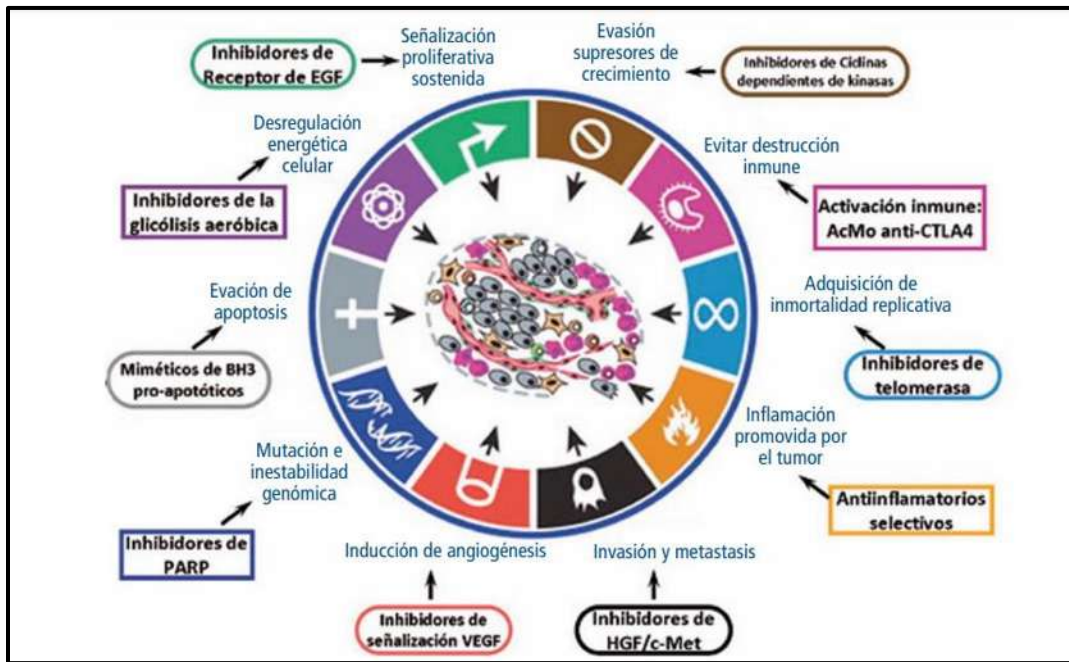


Figura 2. Enfoque terapéutico de los rasgos del cáncer. (Modificado de *Hanahan D, Weinberg, 2011*)

2.3. Mecanismos de muerte celular

Es de suma importancia caracterizar las vías involucradas en la muerte celular para poder entender las patologías que se presentan en el cáncer. Existen dos mecanismos principales de muerte, la necrosis y la apoptosis.

2.3.1. Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular resultante de perturbaciones ambientales, se refiere a un proceso degradativo en el que la célula sufre cambios morfológicos como son formación de vacuolas citoplasmáticas, ruptura de la mitocondria, disgregación de los ribosomas y ruptura de los lisosomas con la posterior ruptura de la membrana celular (*Fink et al., 2005*). Esta pérdida de integridad de la membrana hace que se libere el contenido citoplasmático a la célula vecina, con lo que eventualmente se desencadena una respuesta inflamatoria en el tejido (*Elmore, 2007*).

2.3.2. Necroptosis

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

2.3.3. Apoptosis

La apoptosis se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, como un mecanismo homeostático para mantener la población celular en los tejidos. También, como un mecanismo de defensa, o cuando las aberraciones genéticas de las células precursoras tumorales inducen con frecuencia su muerte por apoptosis, sin embargo, durante en el proceso de malignización estas células pueden adquirir cambios que conducen a la disfunción en genes y proteínas implicados en las vías apoptóticas, permitiendo a dichas células tumorales evadir la apoptosis (Kerr, 2002).

El término apoptosis se utilizó por primera vez en 1972 por Kerr *et al.*, para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular. La apoptosis se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento, como un mecanismo homeostático para mantener la población celular en los tejidos. También, como un mecanismo de defensa, o cuando las células son dañadas por agentes patógenos o nocivos (Norbury y Hickson, 2001). Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto a nivel fisiológico como patológico, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células necesariamente mueren en respuesta al mismo estímulo (Kerr *et al.*, 1972; Kerr, 2002).

La muerte por apoptosis es un proceso homeostático fundamental para mantener regulada la población de células en los tejidos. Así mismo, la apoptosis ocurre cuando las células están dañadas sin remisión, especialmente cuando el daño afecta a su ADN (Hengartner *et al.*, 1994). Existe una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto a nivel fisiológico como patológico, que pueden desencadenar la apoptosis (Kerr *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista morfológico, las células apoptóticas se caracterizan por la contracción celular, la ruptura de las uniones celulares por desmosomas, el incremento de la condensación del citoplasma, aparecen pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana que se denominan “blebs”, se condensa la cromatina en la periferia del núcleo, la posterior fragmentación del mismo, el hinchamiento del retículo endoplasmático y de las mitocondrias, finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos, de esta manera los cuerpos apoptóticos son eliminados del tejido, sin causar una respuesta inflamatoria. Estos cambios morfológicos son una consecuencia de los eventos bioquímicos que ocurren dentro de una célula apoptótica (*Evan et al., 1998; Kurosaka et al., 2003*).

Las características bioquímicas más destacadas de la apoptosis son: la activación de unas proteasas denominadas caspasas, la ruptura de ADN en fragmentos oligonucleosomales, el desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico, generación de radicales libres, la disminución del potencial de membrana mitocondrial y la pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática, exponiéndose la fosfatidilserina en la superficie celular. El punto de no regreso en la apoptosis es cuando las caspasas comienzan a ser enzimáticamente activas uniéndose a sus proteínas blanco (las ejecutoras de la apoptosis) (*Hengartner, 2000*). Los mecanismos de apoptosis son complejos y sofisticados, e involucran una cascada de eventos moleculares que son dependientes de energía. Existen dos vías principales de apoptosis: La vía extrínseca o vía de receptores de muerte y la vía intrínseca o vía mitocondrial (*Elmore, 2007*). Sin embargo, las dos vías están ligadas y las moléculas en una vía pueden influenciar a otras (*Igney et al., 2002*).

2.3.4. Vía intrínseca o mediada por mitocondrias

La ruta intrínseca de inducción de la apoptosis incluye la activación de los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 que ejercen su función en la mitocondria por inducción de la permeabilización de la membrana mitocondria externa. La liberación de diferentes proteínas pro-apoptóticas, que están normalmente presentes en el espacio intermembrana de estos orgánulos, se ha observado durante las etapas iniciales de la apoptosis (*Elmore, 2007*). La liberación del citocromo c (Cyt c) desde la mitocondria es un paso clave en el inicio del proceso apoptótico. Los mecanismos que regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de las proteínas del espacio intermembranal depende

del tipo celular y de la naturaleza del estímulo apoptótico (Gogvadze et al., 2006; Elmore, 2007). Una vez en el citosol, el holocitocromo c (que se forma dentro de la mitocondria) se asocia a la región C-terminal del factor de activación de apoptosis (Apaf-1) que contiene 12-13 repeticiones de unión proteína-proteína (WD40). Esta interacción facilita la unión de dATP con Apaf-1 y la exposición de su motivo CARD N-terminal, el cual puede ahora oligomerizar y formar una plataforma que activa la procaspasa 9. El resultado de la oligomerización de Apaf-1 es un complejo capaz de reclutar varias moléculas de procaspasa 9 inactivas a través de interacciones heterotípicas para formar el llamado apoptosoma (Figura 3). El apoptosoma entonces activa las caspasas iniciadoras (Shi, 2004; Elmore, 2007). La caspasa 9 activa, rompe y activa sucesivamente a la pro-caspasa 3 y 7 que son las responsables de la ruptura de varias proteínas que lideran las características químicas y morfológicas de la apoptosis (Figura 3) (Robertson et al., 2000; Elmore, 2007).

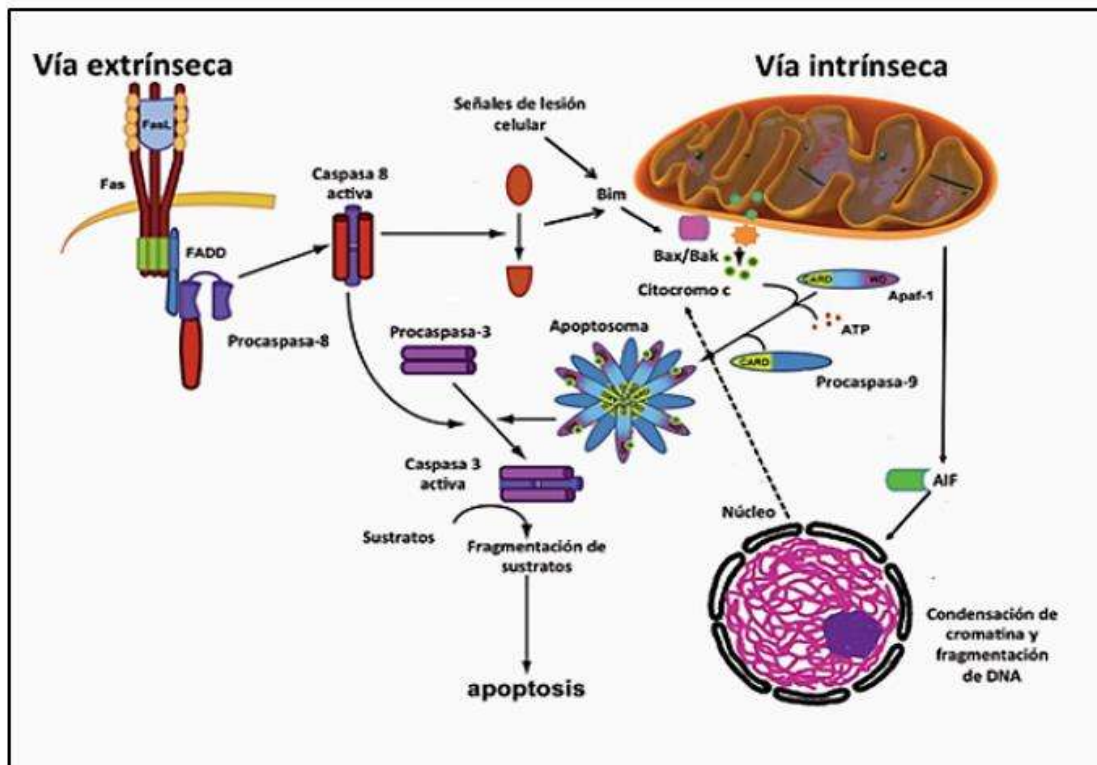


Figura 3. Vías de inducción de apoptosis. Vía intrínseca: Esta vía es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes como es el caso de p53 o daño al ADN y es mediada por la mitocondria, en respuesta a estímulos apoptóticos, posteriormente las proteínas

mitocondriales Bax promueven la liberación de citocromo c el cual una vez en el citosol se une a la procaspasa 9, para que pase a su forma activa y se lleve a cabo la formación de un complejo denominado apoptosoma, el cual activa a la caspasa 9. (Modificado de Rojas et al., 2009). Vía extrínseca: Se puede observar la activación de receptores, así como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. Los ligandos de muerte son constitutivamente homotriméricos y la unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo homotrimérico mínimo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y procaspasa 8.

2.3.5. Vía extrínseca o mediada por receptores

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

3. ANTECEDENTES

3.1. Ciclodipéptidos como moléculas con potencial anticancerígeno

Los ciclodipéptidos (CDPs) y sus derivados, las diketopiperazinas (DKPs o 2,5. DKPs) constituyen una clase de moléculas pequeñas obtenidas por la condensación de dos α -aminoácidos y sintetizadas por un amplio rango de microorganismos, se ha visto que el 90 % de las bacterias Gram negativas los producen (*Carvalho et al., 2012*). Los CDPs son una clase de estructuras privilegiadas de manera natural, ya que tienen la capacidad de unirse

a un amplio rango de receptores, ya que contienen dos enlaces *cis*-amida, dando como resultado dos aceptores y dos sitios donadores, características importantes para la unión a proteínas, posiblemente enzimas y/o receptores farmacológicos (Figura 4) (Borthwick, 2012). Estos CDPs son sintetizados por una familia de enzimas formadoras de enlaces peptídicos dependientes de tRNA llamadas ciclodipéptido sintasas (CDPSs) y también por las NRPS (Péptido Sintetasas no Ribosomales) (Belin et al., 2012; Gondry et al., 2009).

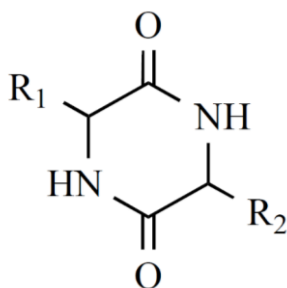


Figura 4. Estructura general de los ciclodipéptidos o 2,5-diketopiperazinas.

Los CDPs cuentan con características que los hacen interesantes para el descubrimiento de nuevas drogas, ya que, farmacológicamente hablando, los péptidos cíclicos son más biodisponibles y más estables contra la degradación por peptidasas que los péptidos lineales. (Carvalho et al., 2012). Es por esto que actualmente se realizan investigaciones para aprovechar las propiedades de los ciclodipéptidos en el tratamiento contra el cáncer.

3.2. Actividades biológicas de los ciclodipéptidos

Los CDPs son moléculas que tienen la capacidad de unirse a un amplio rango de receptores y se le han encontrado diversas actividades biológicas como: antifúngicas, factores de virulencia, inductores de apoptosis etc.

En *Streptomyces fungicidicus* se encontraron cinco diketopiperazinas con propiedades antifouling (fouling del inglés, se refiere a un crecimiento indeseado de organismos sobre las superficies de estructuras marítimas, como plataformas petroleras, barcos, entre otras), dentro de éstos, el ciclo (*L*-Val-*L*-Pro) tiene la actividad antifouling más

fuerte inhibiendo el crecimiento de *Balanus amphitrite* (Xiancui et al., 2006). Ciclo (L-Phe-L-Pro) ha sido aislado de *P. fluorecens* y *P. alcaligenes* en sobrenadantes libres de células y se ha reportado que están involucradas en mecanismos de percepción de quórum, los cuáles sincronizan respuestas fisiológicas bacterianas de una manera dependiente de la densidad celular, y el hallazgo de que éste mismo ciclodipéptido es producido por *L. plantarum* puede sugerir la posibilidad de un entrecruzamiento entre sistemas de señalización de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Ström y Sjögren, 2002).

Se han reportado otras actividades biológicas para los CDPs, como es el caso de *Lactobacillus plantarum* cepa MiLAB 393 de donde fueron aislados los CDPs ciclo (L-Phe-L-Pro) y ciclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), los cuales muestran propiedades antifúngicas contra mohos y levaduras (Ström et al., 2002). El ciclo (L-Phe-L-Pro) de *Lactobacillus plantarum* induce apoptosis en células cancerosas de colon HT-29 (Brauns et al., 2004).

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

Los CDPs de *P. aeruginosa* (PAO1-CDPs) son sintetizados a través de las péptido sintetasas no ribosomales y se determinó que los PAO1-CDPs influyen en la detección del quórum sensing (González et al., 2016). En 2019, Corona-Sánchez y colaboradores reportaron que los PAO1-CDPs promueven el crecimiento y desarrollo del maíz, a través de la vía de señalización TOR/S6K como un mecanismo de crecimiento de la planta y desarrollo de raíces en la interacción planta-microorganismo.

Se ha demostrado que los ciclodipéptidos producidos por una amplia gama de organismos tienen efectos citotóxicos en líneas celulares cancerosas (Hong et al., 2008; Fokas et al., 2010). En este contexto, se evaluó el efecto de la mezcla de los PAO1-CDPs en las líneas cancerosas humanas HeLa (cáncer cervico-uterino) y CaCo-2 (cáncer colorectal), los resultados mostraron que los PAO1-CDPs promueven muerte celular por apoptosis en ambas líneas celulares cancerosas, con una concentración inhibitoria 50 (IC50) de 0.53 y 0.66 mg/mL, respectivamente (Figura 5). En 2020, Durán-Maldonado y colaboradores reportaron que los PAO1-CDPs disminuyeron el tamaño y la formación de tumores en un modelo in vivo de melanoma murino (Durán Maldonado et al., 2020).

Adicionalmente se demostró el efecto de los PAO1-CDPs en células no cancerosas, en células humanas NOVA (fibroblastos de pulmón humano obtenidas a partir de un cultivo primario de tejido de pulmón), y en células de epitelio mamario bovino), los resultados mostraron que los PAO1-CDPs no afectan la viabilidad de las células (Vázquez-Rivera et al., 2015).

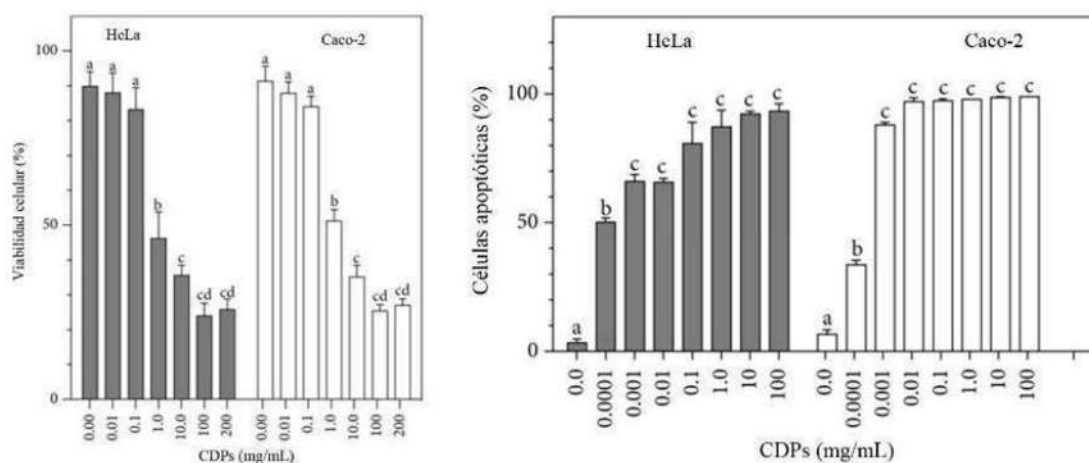


Figura 5. Efecto de los CDPs sobre líneas celulares HeLa y CaCo-2. En la gráfica de la izquierda se muestra la viabilidad celular en forma dependiente de la dosis de los PAO1-CDPs sobre las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2. En la gráfica de la derecha se muestra la apoptosis en forma dependiente de la concentración de los PAO1-CDPs sobre las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2 (Modificado de Vázquez-Rivera et al., 2015).

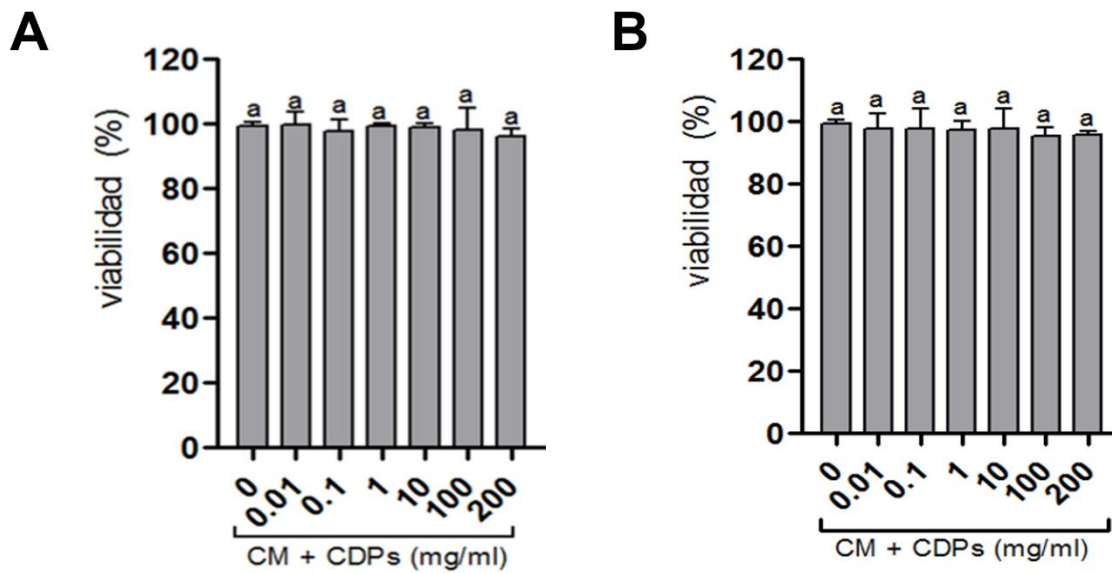
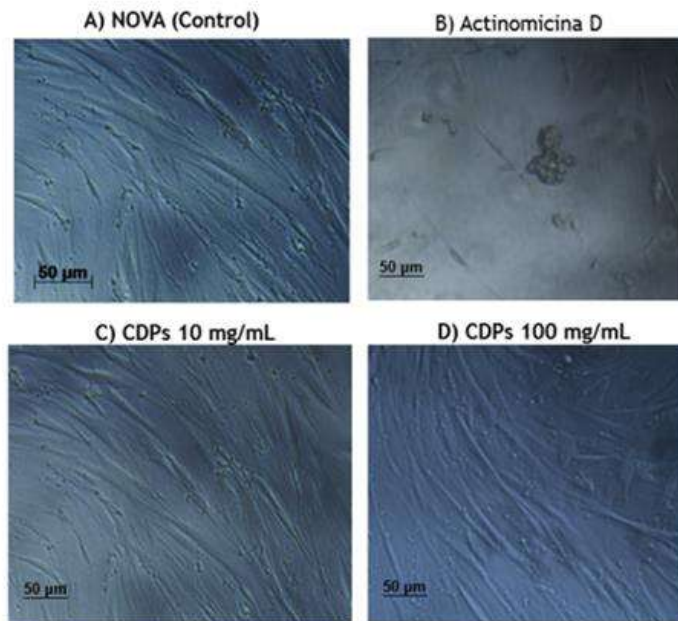


Figura 6. Efecto de los CDPs sobre líneas celulares de fibroblastos de pulmón humano y células de epitelio mamario bovino. En las fotografías A, B, C y D, se muestran células NOVA sin tratamiento, tratamiento con Actinomicina D y tratamiento con los PAO1-CDPs, respectivamente. En las gráficas A) muestra el efecto de los PAO1 CDPs en la viabilidad de fibroblastos de pulmón humano (NOVA) y en B) células de epitelio mamario bovino, respectivamente (Modificado de *Vázquez-Rivera, 2014*).

En nuestro grupo de trabajo, se reportó que el mecanismo por el cual los PAO1-CDPs inducen muerte celular por apoptosis es a través de la vía de apoptosis intrínseca, mediante la inhibición de la fosforilación de las proteínas Akt (Ser 473) y S6K (Thr 389) (Hernández Padilla et al., 2017). mTORC2 es un complejo cinasa que fosforila a Akt en su residuo Ser 473 causando su máxima activación; la fosforilación de Akt dependiente de mTORC2 conduce a la activación de mTORC1. Por lo tanto, mTORC2 puede inhibir indirectamente la autofagia (Kim et al., 2015).

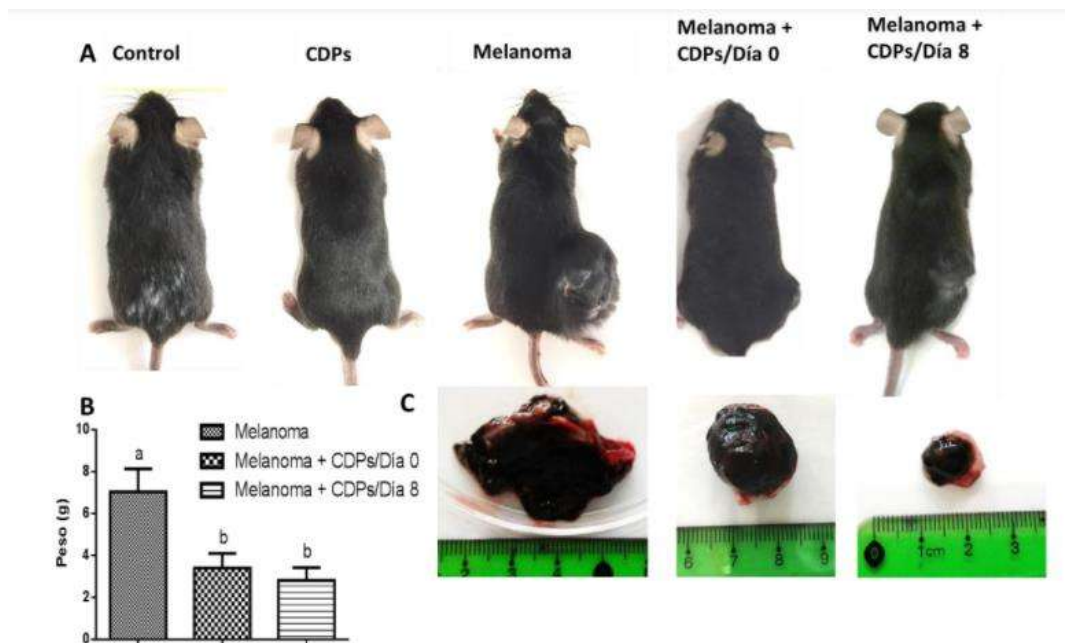


Figura 7. Efecto de los CDPs sobre tumores en modelo de melanoma murino. Fotografías representativas de ratones pertenecientes a cada uno de los grupos; B) grafica de los pesos de los tumores; C) fotografías representativas de los tumores al momento del sacrificio. Las barras representan media \pm error estándar de un experimento, $n = 6$. Se usó ANOVA de una vía con prueba de Bonferroni. La significancia estadística ($P < 0.05$) de las diferencias entre tratamientos se indica con letras diferentes. Las diferencias significativas entre los grupos se indican con letras diferentes (Modificado de Durán Maldonado et al., 2020).

De esta forma el comportamiento de fosforilación cíclica de Akt-S473 observados durante el tratamiento con los PAO1-CDP de las células de HeLa sugiere que la actividad del complejo mTORC2 puede estar involucrado posiblemente a través de mantener inhibida la autofagia asegurando la inducción de apoptosis como vía de muerte de las células cancerosas (Hernández-Padilla, et al., 2017). Además, mTORC2 está involucrado

principalmente en reorganización del citoesqueleto de actina, y más recientemente, en la regulación del crecimiento, la proliferación, el metabolismo energético y la resistencia a los medicamentos (Guri et al., 2017). Cabe resaltar que mTORC2 es fútil para epitelio de células sanas o fibroblastos de embrión, mientras que es muy necesario para células cancerosas que tienen hiperactivada la vía de señalización PI3K/Akt. Esto indica que la inhibición del complejo mTORC2 puede ser más deletérea para células cancerosas que para células normales, de forma que inhibidores de mTORC2 causarían menos toxicidad en células sanas.

En este sentido, se desconoce si los PAO1-CDPs modulan otras vías relacionadas con los procesos requeridos para el crecimiento, supervivencia y proliferación de células cancerosas, los cuales son eventos importantes regulados por el complejo mTORC2, por lo que la caracterización de los mecanismos de acción de los PAO1-CDPs permitirá dilucidar si éstos tienen capacidad multiblanco inhibiendo al complejo mTORC1 y mTORC2, proponiendo a los CDPs -PAO1 como un fármaco con alto potencial anticanceroso.

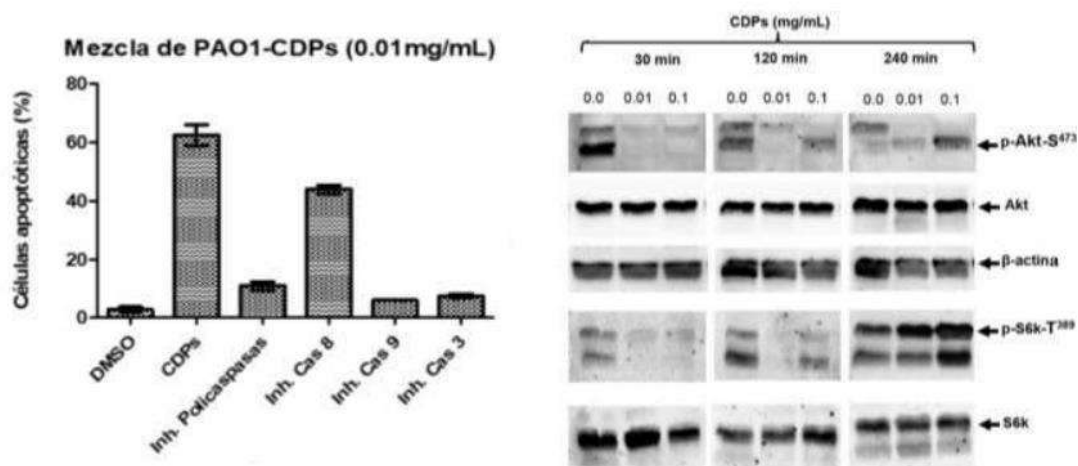


Figura 8. Inducción de apoptosis en células HeLa por los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. A la izquierda; ensayo de inducción de apoptosis usando inhibidores de caspasas participantes en las diferentes vías apoptóticas. A la derecha, ensayo de inmunodetección por Western blot de las formas fosforiladas y desfosforiladas de las cinasas Akt y S6k a diferentes concentraciones de los PAO1-CDPs y tiempos de tratamiento. (Modificado de Hernández Padilla et al., 2017).

Estudios recientes realizados por *Hernández Padilla et al., 2020* demostraron que los CDPs inhiben la fosforilación de las proteínas cinasas Akt en el residuo Ser473 y S6K en el residuo Thr389, induciendo apoptosis en la línea celular HeLa. Adicionalmente se encontró que el efecto citotóxico de los PAO1-CDPs se efectúa a través de la vía de señalización PI3k/Akt/mTOR mediante los complejos mTORC1 y mTORC2, de una manera dependiente de la participación del complejo TSC1/TSC2 (Figura 9). Los resultados obtenidos indican que la desregulación y comunicación cruzada de las diferentes vías de señalización en la línea celular HeLa, las cuales se asocian con su agresividad y recurrencia, fueron impactadas como blancos moleculares por los PAO1-CDPs. Lo anterior sugiere que los PAO1-CDPs pueden ser considerados como potenciales drogas antineoplásicas.

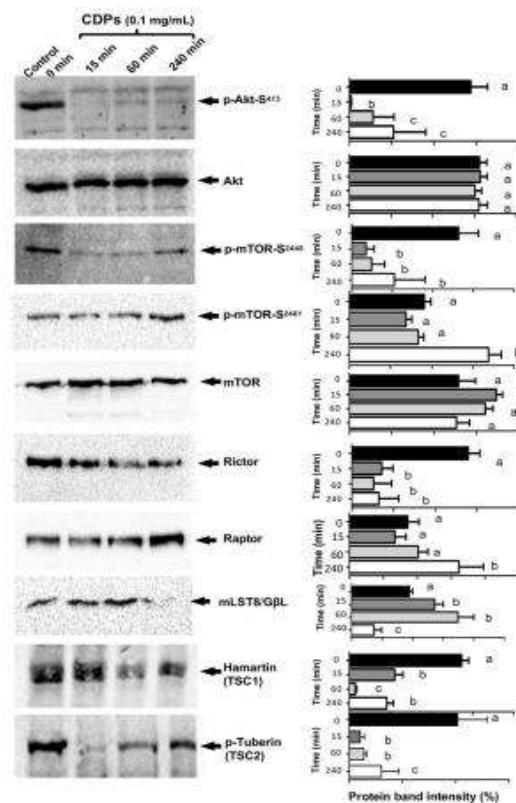


Figura 9. Efectos de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, implicados en la vía de señalización de mTOR en células HeLa. Las células HeLa se homogeneizaron para obtener extractos de proteínas utilizados para ensayos de transferencia Western blot. Las imágenes representativas corresponden a la transferencia Western utilizando extractos de proteínas de al menos tres ensayos independientes utilizando el anticuerpo indicado en la figura. Los anticuerpos utilizados fueron los

siguientes; p-Akt-S473, Akt, p-mTOR S2481, p-mTOR S2448, mTOR, Rictor, Raptor, Harmatin (TSC1), p-tuberina (TSC2), tuberina, p-p70S6k-T389, Rheb, H-Ras, HSP27, p-PTEN-S380, GβL, ULK, P53-S15 y β-actina (Modificado de *Hernández Padilla et al.*, 2020)

Uno de los retos más importantes en la terapia contra el cáncer es tener fármacos con selectividad únicamente en las células cancerosas y que no dañen las células normales, así como a las células de la respuesta inmunológica de acuerdo los antecedentes obtenidos de los CDPs-PAO1 es de nuestro interés en el presente trabajo realizar estudios pre-clínicos y con la meta de desarrollo de un potencial fármaco para el tratamiento de leucemia en pacientes con este padecimiento.

4. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la mezcla de ciclodipéptidos (CDPs), ciclo(*L*-Pro-*L*-Tyr), ciclo(*L*-Pro-*L*-Val) y ciclo(*L*-Pro-*L*-Phe) producidos por *P. aeruginosa* PAO1 poseen efecto citotóxico en las líneas celulares cancerosas humanas HeLa y CaCo-2 a través de inducir selectivamente la apoptosis de las células cancerosas por mecanismos que involucra diferentes vías de señalización. Además, se demostró que estos ciclodipéptidos presentan un efecto antitumoral en un modelo *in vivo* de melanoma murino sin afectaciones en los animales sanos. Por lo tanto, es de nuestro interés analizar el efecto de estos compuestos en muestras directas de pacientes con leucemia, con la finalidad de continuar con los estudios pre-clínicos y establecer si los CDPs tienen un efecto citotóxico en estas células cancerosas a través de la inducción de la apoptosis.

5. HIPÓTESIS

El mecanismo de citotoxicidad de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* en células neoplásicas de pacientes con leucemia involucra la inducción de apoptosis.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras neoplásicas de pacientes diagnosticados con leucemia.

6.2. Objetivos específicos:

- Determinar el efecto citotóxico de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras neoplásicas de pacientes diagnosticados con leucemia.
- Identificar el mecanismo de citotoxicidad de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* en muestras neoplásicas de pacientes con leucemia.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Medio de cultivo

Medio utilizado: RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium)

Medio completo. Composición: RPMI con 2 mM L-glutamina y 10 mM de HEPES, 1 mM piruvato sódico, 4500 mg/L glucosa y 1500 mg/L, NaHCO₃ 1.5 gr/L, Penicilina/Estreptomicina 10,000 U/mL de Penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma) 1 %, suero fetal bovino (SFB, Sigma) 10 %.

Medio incompleto. Composición: Roswell Park Memorial Institute Medium con 2 mM L-glutamina y 10 mM de HEPES, 1 mM piruvato sódico, 4500 mg/L glucosa y 1500 mg/L, NaHCO₃ 1.5 gr/L.

7.2. Toma y clasificación de muestras

Desarrollado por el personal del Hospitales Infantil de Morelia. En base al protocolo establecido conjuntamente aprobado por el comité de ética del hospital. Indicando, edad y sexo del paciente, el tipo de Leucemia y demás datos relevantes que se consideren necesarios.

7.3. Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1

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

7.4. Extracción de la mezcla de CDPs de *P. aeruginosa* PAO1

Se inocularon 2 mL de medio LB con *P. aeruginosa* cepa PAO1 (pre-inoculo) y se incubó durante 12 h a una temperatura de 37 °C en agitación oscilante de 200 rpm. Posteriormente se inoculó 1 L de medio LB con el pre-inóculo y se incubo durante 24 h. Una vez trascurrido el tiempo se procedió a centrifugar a 7000 rpm por 10 min para recuperar el sobrenadante.

Para la extracción de la mezcla de CDPs, al sobrenadante se le agregó un volumen igual de acetato de etilo con ácido acético 0.01 % v/v y se realizaron dos agitaciones vigorosas durante 2 min. Al finalizar se recuperó la fase orgánica y se repitió el procedimiento anterior.

Una vez obtenida la fase orgánica, se procedió a evaporar hasta sequedad (Rotavapor R-215; Buchi) a 60 °C. A la cantidad recuperada se solubilizó con 1 mL de acetato de etilo acidificado. La muestra fue concentrada hasta sequedad en vacío en un Concentrador (LABCONCO).

7.5. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La muestra obtenida de la extracción de los CDPs se analizó por HPLC (Varian ProStar 335 Diode Array Detector) con un gradiente lineal de H₂O:acetonitrilo a un flujo constante de 0.5 mL/min, usando una columna para cromatografía en fase inversa Agilent Polaris 3C19-A a 50 °C. Se utilizó la absorbancia de 210 nm en el intervalo UV y el detector LaChrom HITACHI UV-VIS L2420. El agua desionizada y el acetonitrilo grado HPLC fueron filtrados y desgasificados.

7.6. Purificación de los CDPs

Se añadió la mezcla de CDPs a una columna cromatográfica, con un flujo constante de 3 mL/min se eluyeron diferentes fases móviles conformadas por metanol: H₂O en distintas relaciones (2:98, 10:90, 25:75, 40:60 y 90:10) recolectando las fracciones eluidas y midiendo su densidad óptica a una absorbancia de 230 nm con la finalidad de establecer las posibles fracciones contenedoras de los CDPs. Para confirmar la presencia de CDPs en las fracciones, se realizó un análisis mediante HPLC y GC-MS.

7.7. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

Para verificar la presencia y pureza de los CDPs en las diferentes fracciones obtenidas se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Agilent GC System 7890A equipado con Agilent MSD 5975C) (GC-MS), usando He como gas

acarreador a un flujo de 1 mL/min, usando una columna capilar de 30 m x 250 μm x 0.25 μm , con una matriz de 5 % de fenil metilsiloxano, con una temperatura de detector de 300°C y de 250°C de inyección. El volumen de la muestra inyectada fue de 1 μL .

7.8. Aislamiento de células mononucleares por centrifugación diferencial de densidad de componentes sanguíneos

La muestra sanguínea recolectada en tubo con tapón lila y anticoagulante K2 EDTA (BD Vacutainer) se diluyó en proporción 1:1 con PBS estéril hasta su completa homogeneización. En un tubo cónico tipo falcon fue colocado el reactivo Ficoll-Paque Plus (Cytiva) en relación 3:2 con la cantidad de sangre diluida anteriormente, la cual fue agregada posteriormente al tubo, teniendo cuidado de no mezclarlo con el reactivo. El tubo fue sellado y centrifugado a 1200 x g durante 30 minutos para obtener por diferencia de densidades de los componentes sanguíneos, la separación de los mismos.

La fase de células mononucleares fue identificada como una capa grisácea opaca por debajo de la fase correspondiente al plasma y por encima de la fase correspondiente al reactivo utilizado.

Finalmente, la fase de células mononucleares fue aislada cuidadosamente mediante pipeteo y se le realizaron lavados con PBS en 2 ocasiones a 2000 rpm durante 10 minutos.

7.9. Identificación de células mononucleares en microscopio óptico mediante tinción Wright

Para confirmar la presencia de células mononucleares en la fase aislada de las muestras sanguíneas se empleó la tinción de Wright. Se colocó 10 μL de la fase sanguínea aislada en un portaobjetos y se dejó reposar hasta sequedad, posteriormente utilizando 500 μL de colorante Wright (Hycell) se cubrió totalmente la superficie del portaobjetos y se dejó actuar durante 3 minutos. Transcurrido el tiempo se añadieron 500 μL de solución amortiguadora de fosfatos de pH 6.4 y se dejó actuar 3 minutos. Al finalizar el tiempo establecido se realizó un lavado cuidadoso con agua desionizada.

El portaobjetos se dejó reposar hasta sequedad para finalmente ser observado en el microscopio óptico a 100X para la adecuada visualización e identificación de las células mononucleares teñidas de color morado por el colorante Wright.

7.10. Ensayo de viabilidad celular por el método colorimétrico de MTT

Las células mononucleares fueron expandidas con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Hyclone SFB), 100 U/mL de penicilina-estreptomina, 40 µg/mL de gentamicina (Pharma Life) y 1 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen) conocido como medio completo (CM) en cajas de cultivo celular de 60X15 cm (Costar-Corning) y fueron incubadas en una atmósfera de 5 % de CO₂ a una temperatura de 37°C.

Para determinar la viabilidad por el método colorimétrico de MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich Co), las células mononucleares fueron sembradas 3×10^4 células por pozo en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen de 200 µl de medio completo (CM). Posteriormente las células se estimularon con diferentes concentraciones de los CDPs (0.001, 0.01, 0.1 y 1 mg/mL), como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs.

Posteriormente se añadió 10 µl de MTT (5 mg/mL) en cada pozo y se incubó durante 4 H a 37°C. Finalmente, se adicionó 100 µL de 2-propanol-HCl 1 M (19:1 v/v) para disolver los cristales de formazán y se procedió a las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro de microplacas Biotek Epoch. Los datos fueron recolectados y extraídos con el software Microplate Manager (Biotek).

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

Se sembraron 3×10^4 células mononucleares por pozo en placas de 96 pozos de fondo plano en un volumen de 200 µl de medio completo (CM). Se trataron con diferentes concentraciones de los CDPs (0.001, 0.01, 0.1 y 1 mg/mL), como control negativo se utilizó DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs.

Después de 4 horas posteriores a la estimulación, las células fueron centrifugadas a 600 x g durante 5min a 4 °C. El paquete celular fue lavado con PBS frío y se resuspendió en 300 µL de buffer para anexina V (BD, California EU) durante 15 min a 4 °C. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 600 g durante 5 min a 4 °C y resuspendidas en 50 µl de buffer de Anexina V, se adicionó un 1 µL de Anexina V conjugada con FitC y 1 µL de Ioduro de Propidio (PI) (Dead Cell Apoptosis kit; Molecular ondas, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU). La suspensión celular se incubó durante 15 min a 4 °C protegido de la luz. Finalmente, se adicionó 300 µL de buffer para Anexina V. Se leyeron 10 000 eventos en el citómetro de flujo C6 Accury (BD, California, EU) y se analizó la emisión de fluorescencia a 495/519 nm y 535/617 nm en el canal FL1 y FL2 respectivamente en el programa Flowjo V12.1 (Tree stat, EU).

7.12. Ensayo de hemolisis por espectrofotometría

A partir de la muestra sanguínea obtenida y posterior a la separación de los componentes de la misma, utilizando la fase eritrocitaria, se elaboró una dilución de eritrocitos:PBS 1:50, esta es agregada a una solución de PBS en placa de 96 pozos y expuesta a las diferentes concentraciones de CDPs (0.01 y 0.05 mg/ml) durante 2 horas a 37 °C. Como control negativo se utilizó la solución diluyente (PBS) y como control positivo de hemolisis una solución de Tritón X-100 al 20 %. Transcurrido el tiempo, se recupera el sobrenadante y se lee su densidad óptica a 540nm en el espectrofotómetro de microplacas Biotek Epoch.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de n=3. Los análisis estadísticos se realizaron con análisis de varianza (ANOVA) unidireccional o bidireccional con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$. Todos los datos se analizaron con el Programa Prism (GraphPad 7.0).

9. RESULTADOS

9.1. Extracción y separación de ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Se analizó la mezcla de ciclodipéptidos extraída de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) con el objetivo de comprobar la presencia de dichos compuestos, de acuerdo a los tiempos de retención establecidos por los ciclodipéptidos de origen sintético (Pro-Tyr), (Pro-Val) y (Pro-Phe).

De acuerdo a la figura 10 los picos obtenidos en el cromatograma indican la presencia de los ciclodipéptidos (Pro-Tyr) en el tiempo de retención en el minuto 3.5, (Pro-Val) en el minuto 4.4 y (Pro-Phe) en el minuto 7.8.

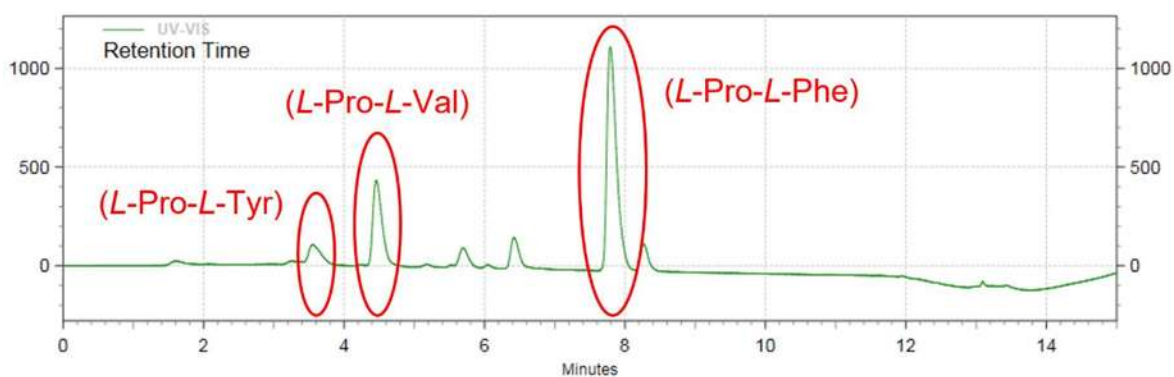


Figura 10. Cromatograma de la mezcla de ciclodipéptidos extraídos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Posteriormente, la mezcla de ciclodipéptidos fue cargada a una columna cromatográfica y se utilizó para su elución diferentes mezclas de metanol:agua en orden ascendente de polaridad (2:98, 10:90, 25:75, 40:60 y 90:10) con la finalidad de separar los ciclodipéptidos en diferentes fracciones de las cuales se midió la densidad óptica y fueron analizadas por HPLC obteniendo los siguientes resultados:

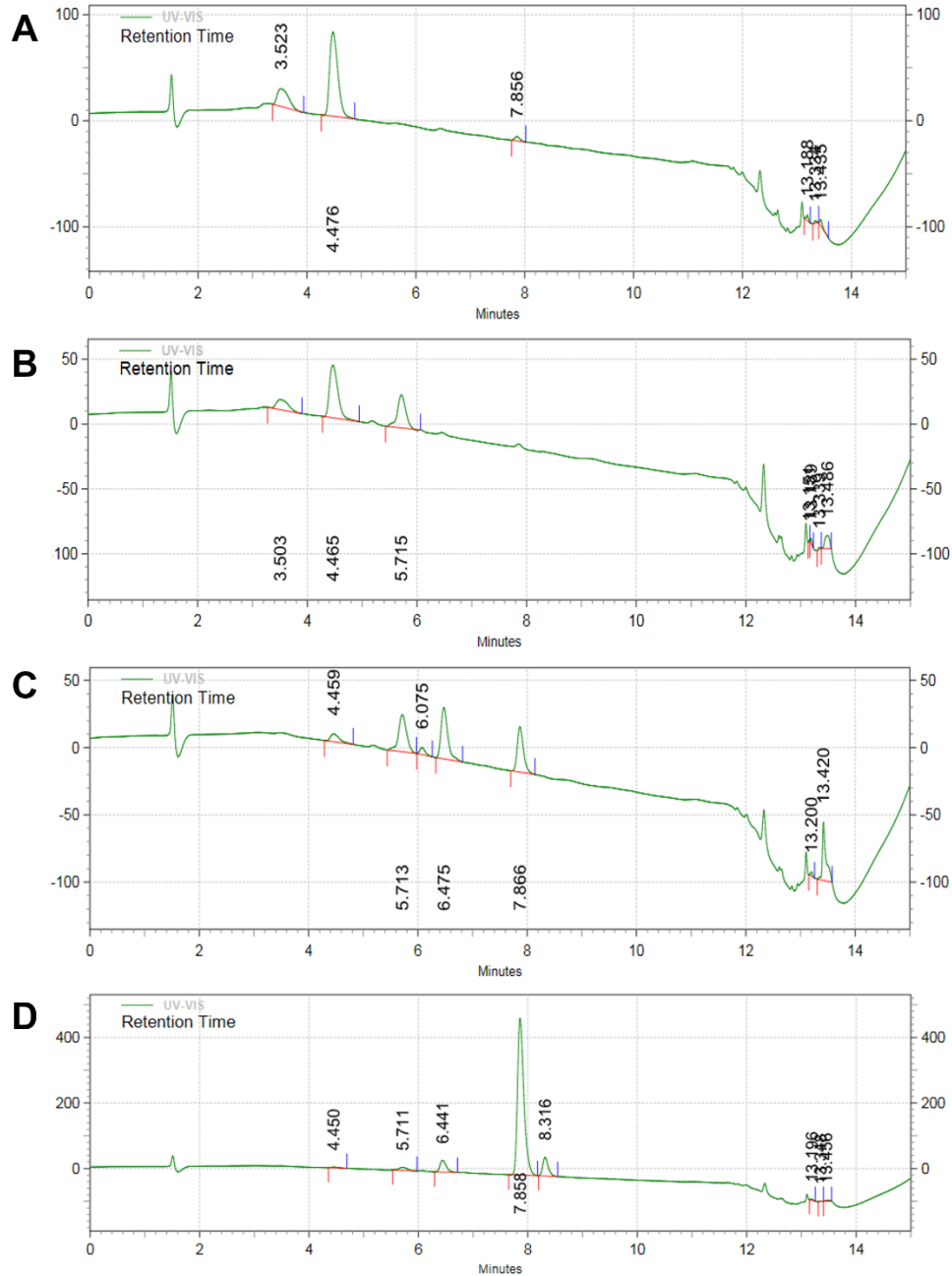


Figura 11. Cromatogramas de las diferentes fracciones obtenidas de CDPs. De acuerdo a los estándares establecidos y a los resultados reportados para la mezcla de CDPs, posterior a su separación se pudieron identificar las siguientes fracciones con los CDPs en cada una de ellas. **A** correspondiente a la fracción 2. Se identifican los CDPs (Pro-Tyr) minuto 3.5, (Pro-Val) minuto 4.4 y (Pro-Phe) minuto 7.8. **B** Fracción 3: CDPs (Pro-Tyr) minuto 3.5 y (Pro-Val) minuto 4.4. **C** Fracción 4: CDPs (Pro-Val) minuto 4.4 y (Pro-Phe) minuto 7.8. **D** Fracción 5: CDPs (Pro-Val) minuto 4.4 y (Pro-Phe) minuto 7.8.

9.2. Aislamiento e identificación de las células mononucleares a partir de muestra de medula ósea y de sangre periférica.

La comprobación de la presencia de las células mononucleares en la fase aislada se realizó utilizando una tinción de Wright, donde de acuerdo a la figura 12 se puede apreciar la diferencia en la cantidad de células mononucleares observadas en el microscopio óptico en el objetivo 40X.

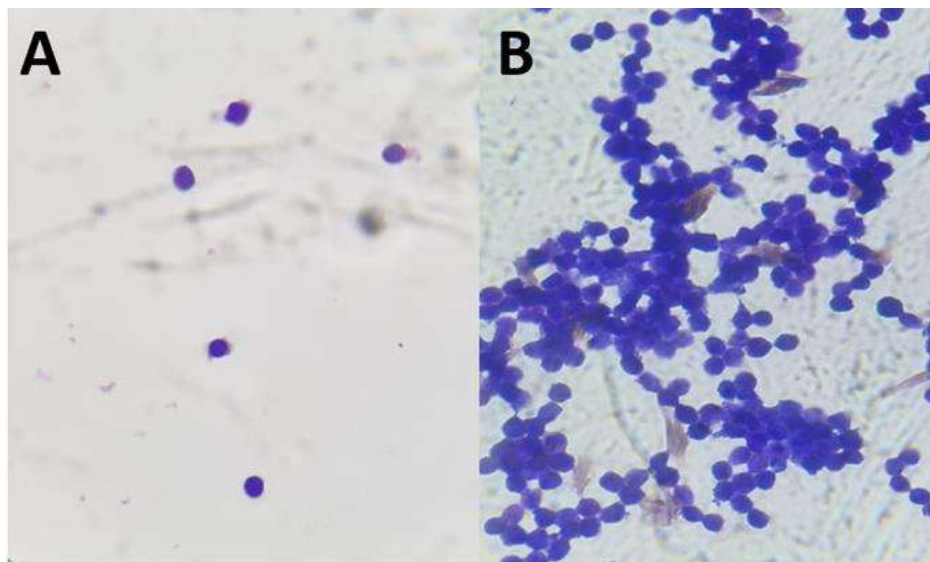


Figura 12. Células mononucleares aisladas. **A** individuo sano. **B** Paciente diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda.

9.3. Las diferentes fracciones obtenidas a partir de la mezcla de ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 presentan efecto citotóxico en línea celular de leucemia mieloide crónica K562

Para comprobar la actividad de las fracciones obtenidas y evaluar el efecto citotóxico que cada una posee sobre la línea celular K562, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular por medio del método colorimétrico MTT. Los datos obtenidos respecto a las fracciones y la disminución de la viabilidad celular se muestran a continuación en la figura 13.

Los tratamientos aplicados fueron las diferentes fracciones de ciclodipéptidos obtenidas, a una concentración de 0.01 mg/mL, utilizando como control positivo de viabilidad el vehículo en el cual son disueltos los ciclodipéptidos, que consta de una mezcla

de PBS:DMSO en relación 80:20 así como un medicamento estándar actual para tratar diferentes tipos de leucemia; la vincristina.

Los resultados de la figura 13 mostraron efecto citotóxico para todas las fracciones obtenidas. La reducción de la viabilidad celular va desde 35 % para la fracción 3 y obteniendo como máximo una reducción de la viabilidad de 45 % para las fracciones 4 y 5. Mientras que la vincristina presenta una reducción de viabilidad de aproximadamente 30 %.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que bajo estas condiciones y aplicados a esta línea celular, los ciclodipéptidos obtenidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 poseen un efecto citotóxico similar a la vincristina.

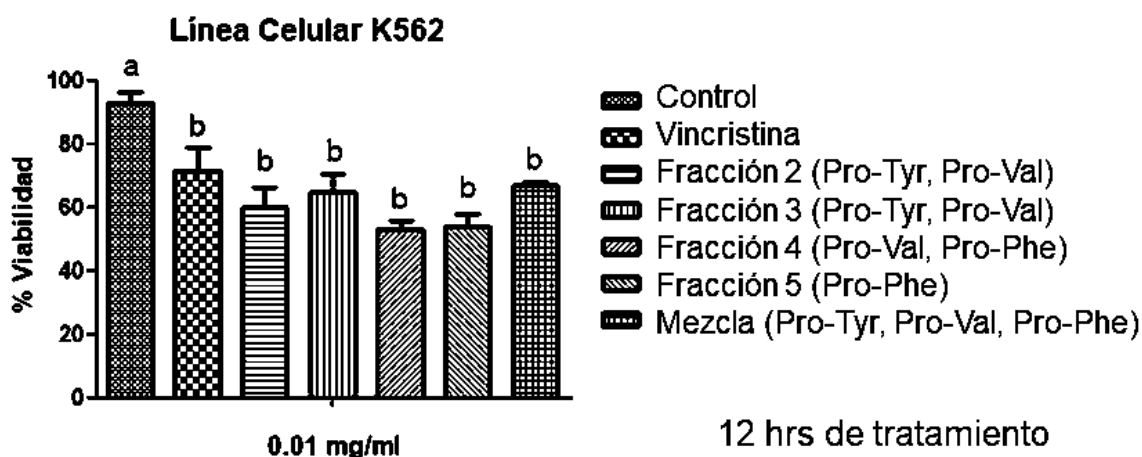


Figura 13. Ensayo de viabilidad sobre línea celular K562 con las diferentes fracciones de ciclodipéptidos. Las barras representan el promedio de $n=3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey con $p < 0.05$. Las letras en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

9.4. Efecto citotóxico de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico que presentan los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre células mononucleares aisladas de pacientes

con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA), se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante método colorimétrico MTT.

De manera paralela, se realizó el mismo ensayo para evaluar la posible citotoxicidad de los ciclodipéptidos sobre células mononucleares aisladas de individuos considerados sanos. Los resultados de ambos experimentos se muestran en las figuras 14 y 15.

Los tratamientos utilizados para ambos grupos de células fueron los siguientes: Control de viabilidad, correspondiente a PBS:DMSO (80:20), Vincristina en concentración de 0.1 mg/mL y ciclodipéptidos en concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 mg/mL.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar un efecto similar en la reducción de la viabilidad de células cancerosas en aproximadamente 80 % para el tratamiento con las 3 concentraciones utilizadas de CDPs lo cual es comparable y similar al obtenido por la vincristina (figura 14). Para el grupo de células sanas no se observó una disminución significativa de viabilidad en ninguno de los 3 tratamientos con CDPs o en la vincristina, comparado con el control (Figura 15).

Es destacable que el efecto que se obtuvo con los CDPs a 0.01 mg/mL es muy parecido al obtenido con la vincristina a 0.1 mg/mL, por lo cual podría considerarse un efecto similar de citotoxicidad con una concentración 10 veces menor de CDPs. Se calculó el IC_{50} obteniendo un valor de 3.2 μ g/mL.

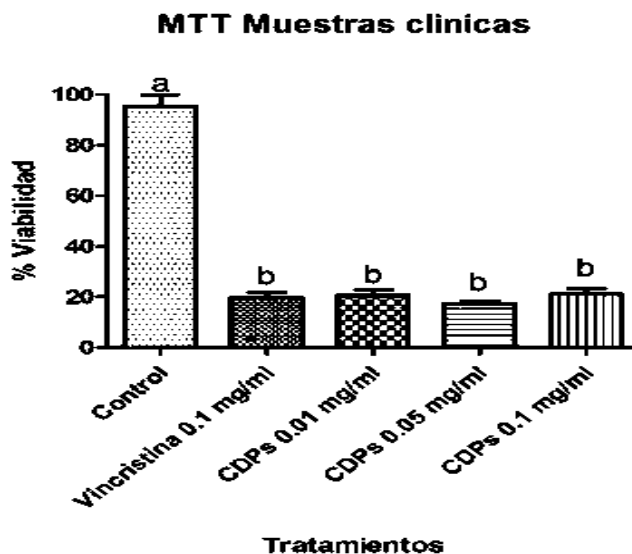


Figura 14. Ensayo de viabilidad celular de células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Las barras representan el promedio de $n=6 + EE$. En esta gráfica se muestra la viabilidad celular (%) en los diferentes grupos analizados. (ANOVA de 1 vía, Tukey Post-Hoc, $p<0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

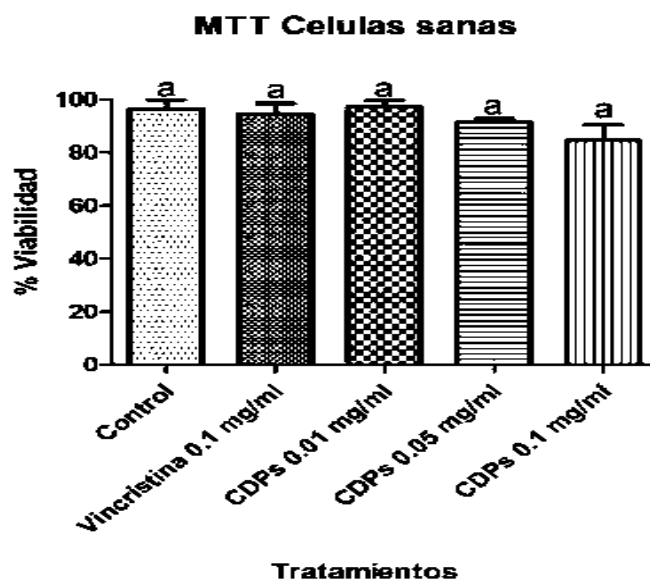


Figura 15. Ensayo de viabilidad celular de células mononucleares aisladas de pacientes considerados sanos. Las barras representan el promedio de $n=6 + EE$. En esta gráfica se muestra la viabilidad celular (%) en los diferentes grupos analizados. (ANOVA de 1 vía, Tukey Post-Hoc, $p<0.05$). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre grupos.

9.5. Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inducen la apoptosis en células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

Con base en los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad celular, se utilizaron las mismas concentraciones de ciclodipéptidos; 0.01, 0.05 y 0.1 mg/mL, vincristina 0.1 mg/mL y una mezcla de PBS:DMSO (80:20) como control de viabilidad para evaluar mediante citometría de flujo el tipo de muerte que los ciclodipéptidos inducen a las células cancerosas aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

Para identificar el tipo de muerte celular inducida por los ciclodipéptidos se utilizaron 2 fluorocromos marcadores de muerte celular; Anexina V como marcador de apoptosis, debido a que esta es capaz de unirse a la fosfatidilserina que se expone en la membrana celular durante el proceso apoptótico y Ioduro de Propidio como marcador de necrosis, ya que este es permeable en células necróticas mediante intercalación entre los ácidos nucleicos de las bases.

En la figura 16 se observan los resultados del ensayo. Se muestran las gráficas de puntos representativas de cada tratamiento. El eje horizontal representa la intensidad de fluorescencia correspondiente a Anexina V y, el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia emitida por el Ioduro de Propidio.

El tiempo de exposición a los tratamientos para este ensayo fue de 4 horas. De acuerdo al análisis realizado de los puntos en la gráfica se puede observar un porcentaje de células apoptóticas de 0.5 % para el control, 79 % para Vincristina y 71.5 %, 81.6 % y 67.5 % para los tratamientos con ciclodipéptidos 0.01, 0.05 y 0.1 mg/mL respectivamente. Esto se representa gráficamente en la figura 17.

A la par de esto se realizó también bajo las mismas condiciones y tratamientos otro experimento de evaluación de tipo de muerte celular en células mononucleares aisladas de individuos sanos donde de acuerdo con la figura 18 se puede observar que los porcentajes de células apoptóticas son aproximadamente 2.6 % para el tratamiento con vincristina, 4.7 %, 7 % y 8.5 % para los tratamientos con ciclodipéptidos de 0.01, 0.05 y 0.1 mg/mL respectivamente.

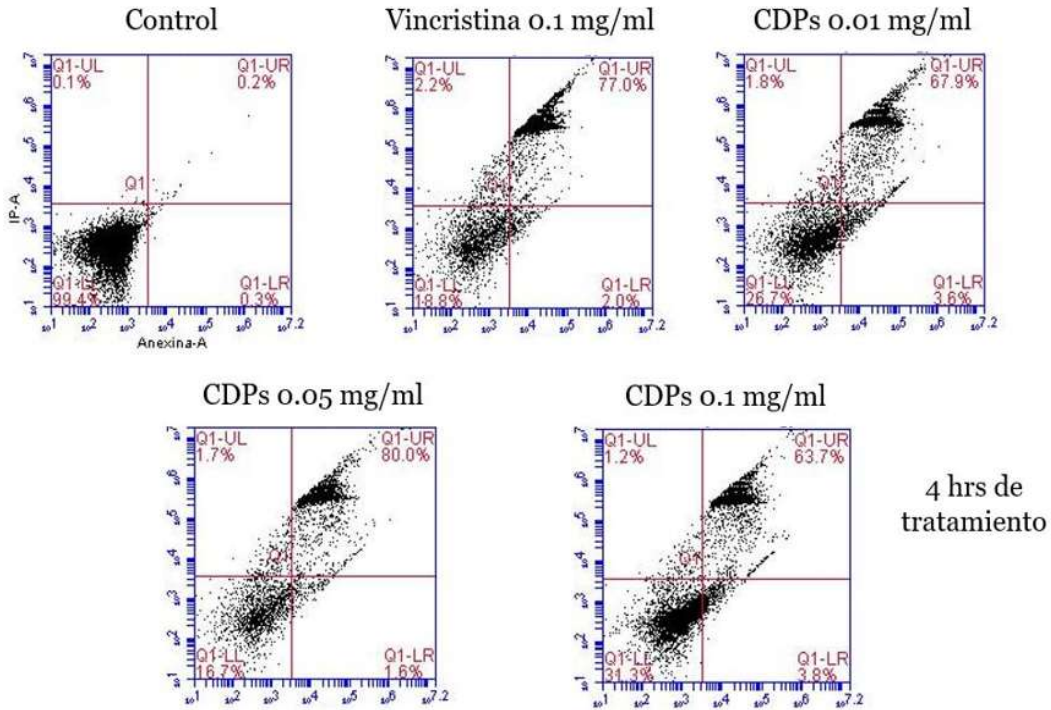


Figura 16. Graficas de puntos representativas del ensayo de Anexina V/Ioduro de Propidio para identificar el tipo de muerte celular inducido por los ciclodipéptidos en células mononucleares de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

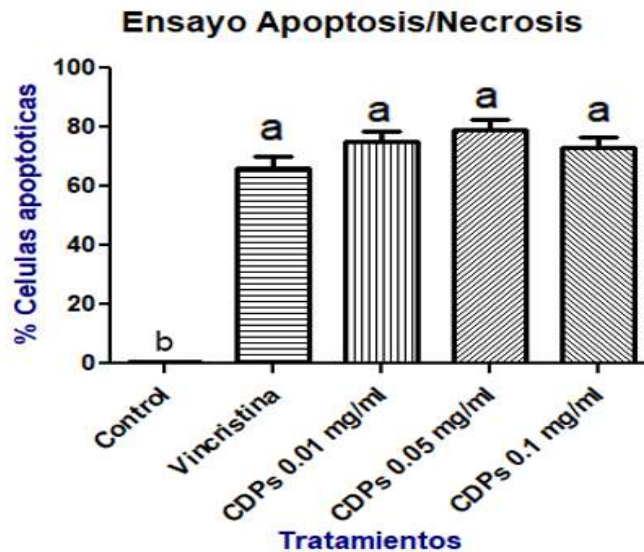


Figura 17. Porcentaje de células apoptóticas en células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda por tratamientos de vincristina y ciclodipéptidos. Las barras representan el promedio de $n=6 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA

de una vía con una prueba post hoc de Tukey con $p < 0.05$. Las letras en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

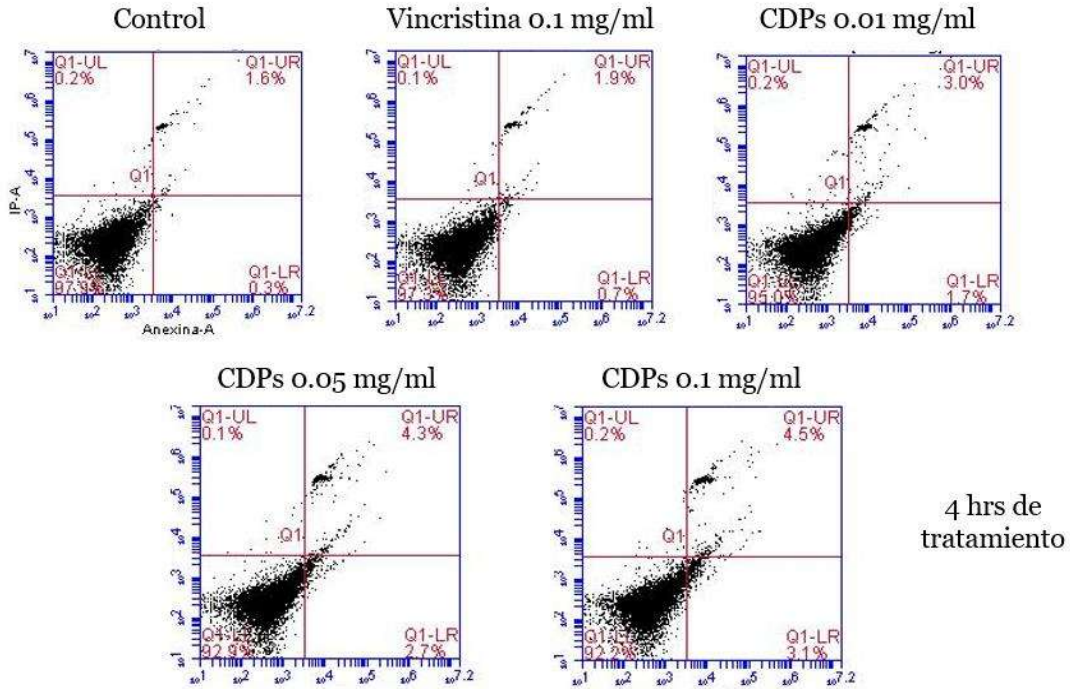


Figura 18. Graficas de puntos representativas del ensayo de Anexina V/Ioduro de Propidio para identificar el tipo de muerte celular inducido por los ciclodipéptidos en células mononucleares de individuos sanos.

9.6. Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 no presentan efecto citotóxico sobre eritrocitos y plaquetas aislados de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

Con la finalidad de evaluar si los ciclodipéptidos aislados de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 presentan efecto citotóxico sobre el resto de los componentes sanguíneos tales como eritrocitos, plaquetas y plasma, se realizó un experimento de viabilidad celular, en el cual se aislaron las fases eritrocitaria y plaquetaria de las muestras de pacientes con leucemia linfoblástica aguda y estas fueron expuestas a tratamiento con ciclodipéptidos a concentración de 0.1 mg/mL y utilizando como control de viabilidad PBS:DMSO (80:20) durante 4 horas para su posterior análisis mediante citometría de flujo con los fluorocromos marcadores de muerte celular: Anexina V como marcador de apoptosis e Ioduro de Propidio como marcador de necrosis.

La figura 19 muestra que de acuerdo a la gráfica de puntos no se presentaron porcentajes de eritrocitos ni de plaquetas con marcaje apoptótico, lo cual resulta un punto favorable para el tratamiento al considerarse como no citotóxico para las demás fases celulares sanguíneas.

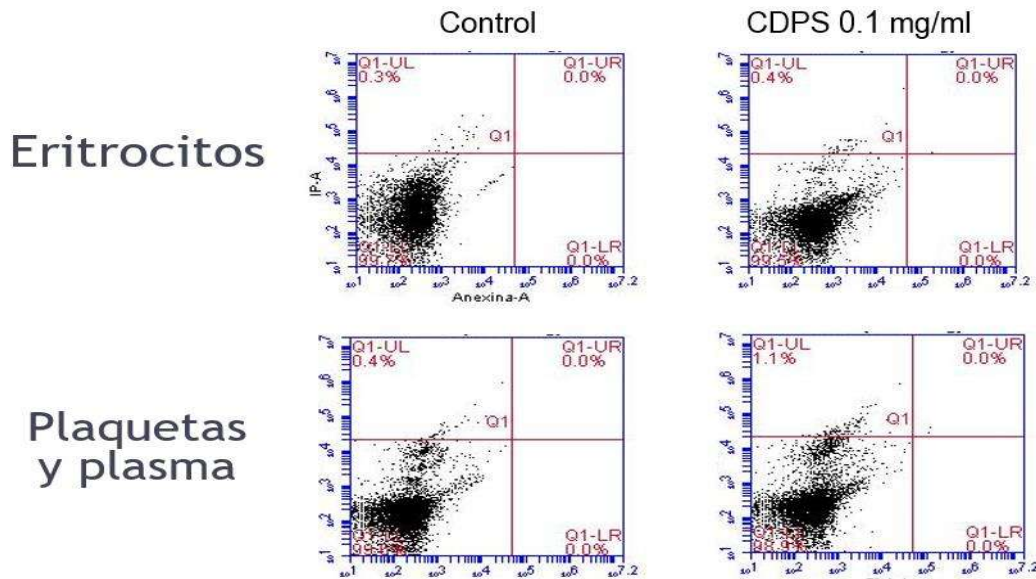


Figura 19. Porcentaje de células apoptóticas en las fase eritrocitaria y plaquetaria aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

9.7. Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 no provocan efecto hemolítico en eritrocitos aislados de sangre periférica de individuos sanos

El objetivo de esta prueba consiste en evaluar la actividad hemolítica de compuestos específicos sobre eritrocitos humanos como criterio de hemo compatibilidad. Utilizando como solución base una dilución de eritrocitos:PBS 1:50, esta es agregada a una solución normotónica en placa de 96 pozos y expuesta a los compuestos de interés durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se recupera el sobrenadante y se lee su densidad óptica a 540nm. Se utiliza como control positivo de hemólisis una solución de Tritón X-100 al 20 % y como control negativo la solución diluyente de la muestra, en este caso PBS.

Se evaluaron 2 concentraciones de ciclodipeptidos 0.01 mg/mL y 0.05 mg/mL en las cuales, de acuerdo a la figura 20 no se mostró un aumento significativo en el porcentaje de hemolisis en comparación al tratamiento control con PBS. Alcanzando los tratamientos con ciclodipeptidos un porcentaje de 3 % y 4 % de hemolisis para las concentraciones de 0.01 mg/mL y 0.05 mg/mL respectivamente.

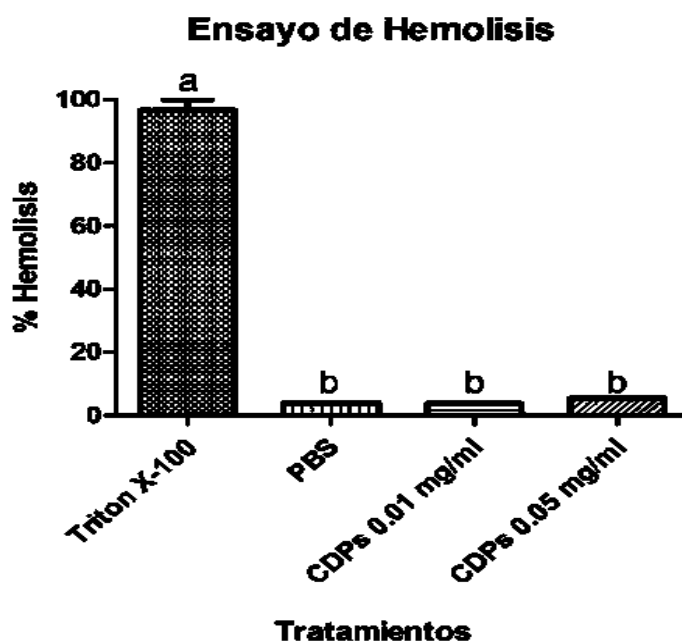


Figura 20. Porcentaje de hemolisis obtenido en los tratamientos con ciclodipeptidos a 0.01 y 0.05 mg/mL. Las barras representan el promedio de $n=3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey con $p < 0.05$. Las letras en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

9.8. Los ciclodipeptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 poseen efecto citotóxico sobre células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizadas como reincidencia.

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico que presentan los ciclodipeptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante método colorimétrico MTT. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: Control de viabilidad, correspondiente a PBS:DMSO (80:20), Vincristina en

concentración de 0.1 mg/mL y ciclodipéptidos en concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 mg/mL. La exposición a los tratamientos fue realizada durante 12 horas.

En la figura 21 se puede observar que existe poca disminución en el porcentaje de viabilidad celular tanto para el tratamiento con vincristina como para las tres concentraciones de ciclodipéptidos, obteniendo una disminución máxima aproximada del 7 % de viabilidad celular a la concentración de 0.1 mg/mL.

De acuerdo a estos resultados se decidió aumentar el tiempo de exposición, así como un orden de magnitud en las concentraciones con ciclodipéptidos, como se muestra en la figura 22.

De acuerdo a la figura 22, después de 24 horas de exposición a los tratamientos con ciclodipéptidos, se puede observar una disminución máxima de la viabilidad de aproximadamente 40 %. Comparando los tratamientos con la vincristina podríamos decir que los ciclodipéptidos a concentraciones 10 veces menor poseen un mejor efecto.

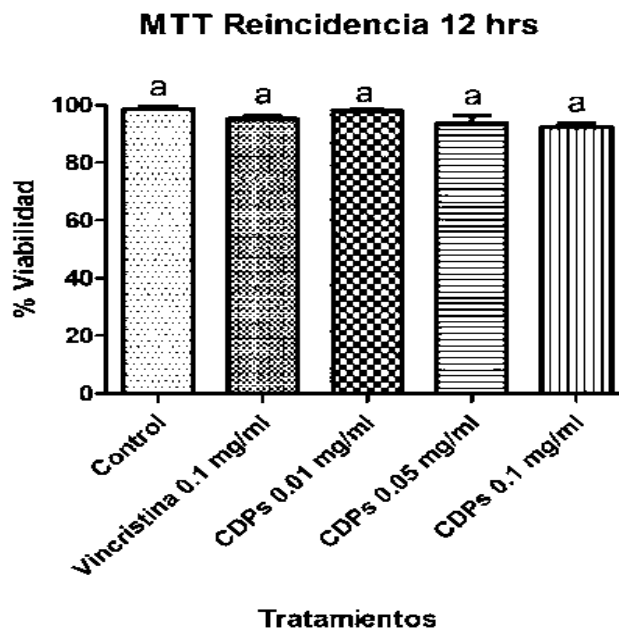


Figura 21. Ensayo de viabilidad celular sobre células cancerosas aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia a 12 horas. Las barras representan el promedio de $n=3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey con $p < 0.05$. Las letras en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

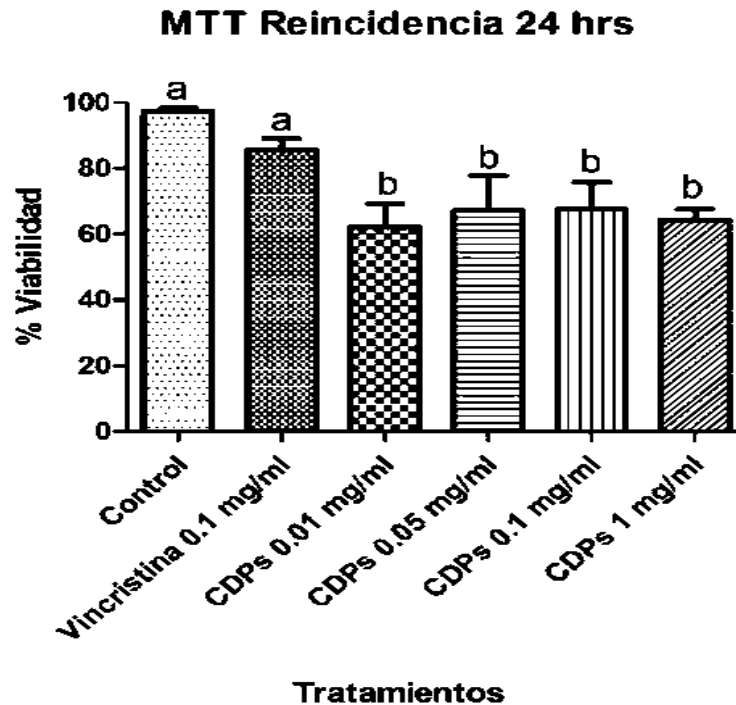


Figura 22. Ensayo de viabilidad celular sobre células cancerosas aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia a 24 horas. Las barras representan el promedio de $n=3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey con $p < 0.05$. Las letras en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

9.9. Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inducen la apoptosis en células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia.

Se evaluó el tipo de muerte celular que los ciclodipéptidos son capaces de inducir en las muestras de leucemia linfoblástica aguda categorizadas como reincidencia mediante citometría de flujo y la utilización de los fluorocromos marcadores de muerte celular; Anexina V como marcador de apoptosis e Ioduro de Propidio como marcador de necrosis.

En la figura 23 se pueden observar las gráficas de puntos se puede observar un porcentaje de células apoptóticas de 11.7 %, 8.5 % y 9 % para las concentraciones de ciclodipéptidos 0.01, 0.05 y 0.1 mg/mL respectivamente durante 4 horas de tratamiento. En

cuanto al tratamiento con vincristina se reflejó un 5.8 % de células apoptóticas. De manera gráfica se representa lo anterior en la figura 24.

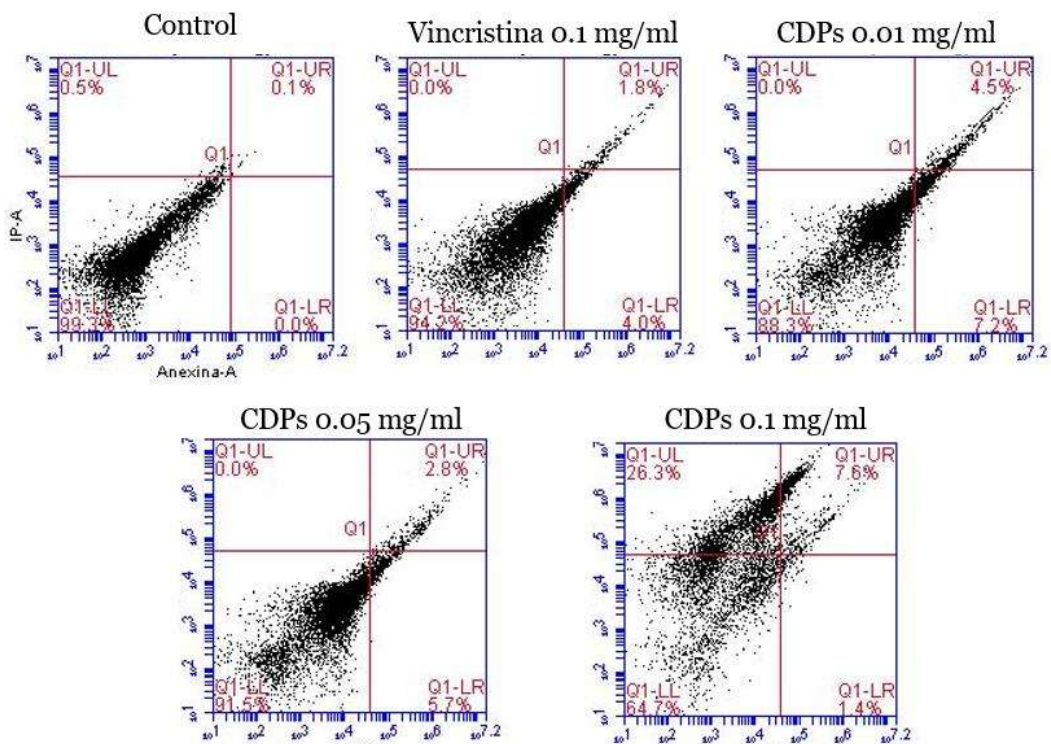


Figura 23. Graficas de puntos representativas del ensayo de Anexina V/Ioduro de Propidio para identificar el tipo de muerte celular inducido por los ciclodipéptidos en células mononucleares de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia.

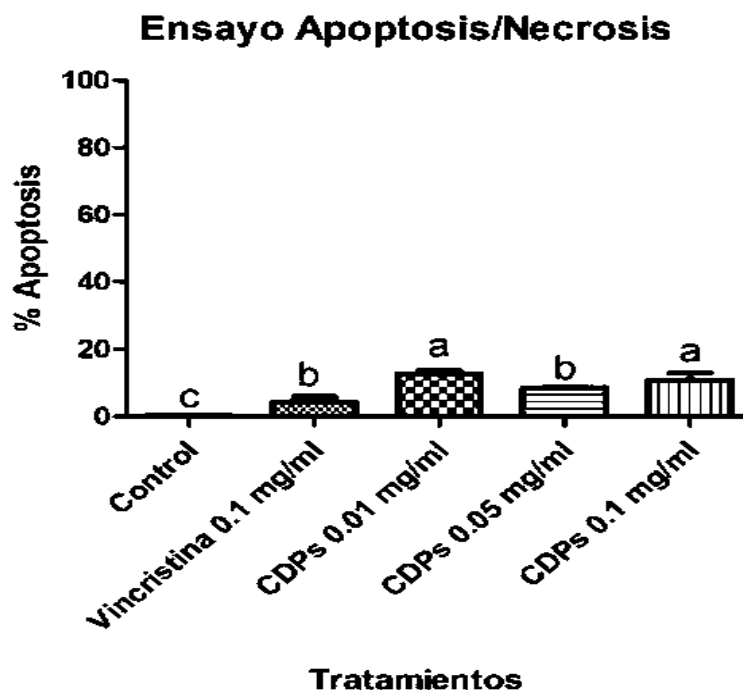


Figura 24. Porcentaje de células apoptóticas en células mononucleares aisladas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda categorizada como reincidencia. Las barras representan el promedio de $n=3 \pm EE$. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey con $p < 0.05$. Las letras en el gráfico representan grupos estadísticamente diferentes.

10. DISCUSIÓN

El cáncer, en sus diferentes variantes, representa un problema de salud pública importante a nivel mundial, incluyendo a la leucemia en uno de los principales tipos causantes de muerte (OMS, 2020). Con la finalidad de desarrollar tratamientos de carácter más selectivo y que sean causantes de un menor daño colateral a los pacientes, el campo de estudio ha permitido el descubrimiento de nuevas alternativas que han reportado resultados exitosos, como es el caso de los ciclodipéptidos (CDPs).

Los CDPs son moléculas pequeñas obtenidas por la condensación de dos α -aminoácidos, que presentan características importantes como la capacidad de unirse a un amplio rango de receptores, una mayor estabilidad y biodisponibilidad en comparación con los péptidos lineales y les son atribuidas a diversas actividades biológicas como: antifúngicas, promotores de crecimiento vegetal, inductores de apoptosis en células cancerosas, etc.

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el efecto antiproliferativo y antitumoral de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, demostrando que disminuyen la viabilidad celular de las líneas celulares cancerosas HeLa, CaCo-2 y B16-F0, además de inducir apoptosis en ellas.

De acuerdo con el *Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos*, se define un compuesto citotóxico como una sustancia que elimina células, como las cancerosas, impidiendo que estas se dividan y crezcan. En el presente trabajo se evaluó la capacidad citotóxica de los ciclodipéptidos sobre células mononucleares aisladas de pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) provenientes del hospital infantil de Morelia, el tipo de leucemia infantil que se registra con mayor frecuencia en este hospital.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente 80 % respecto al control, aplicando concentraciones de CDPs desde 0.01 mg/mL hasta 0.1 mg/mL durante 12 horas de exposición al tratamiento. Con el fin de llevar a cabo una comparación con un fármaco utilizado actualmente como tratamiento estándar contra este tipo de leucemia, la vincristina, que deriva su actividad anticancerígena de la desestabilización de las fibras microtubulares y la detención del ciclo celular en la fase G2/M (*Škubník et al., 2021*). La vincristina se utilizó a concentraciones y tiempo comparables a los utilizados con los CDPs, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se logró observar un efecto citotóxico similar de los CDPs a 0.01 mg/mL en comparación al obtenido por la vincristina a 0.1 mg/mL.

Por consiguiente, esto representa una bioactividad similar para ambos compuestos a dosis 10 veces menor de CDPs comparado con la vincristina.

Aunado a esto, en busca de la determinación de la sensibilidad celular a los compuestos en desarrollo como fármacos, se midió la Concentración Inhibitoria (IC_{50}) que nos indica de la resistencia que tienen las células a un determinado compuesto. El valor obtenido para la IC_{50} fue de 3.2 μ g/mL. Comparando este valor con los resultados reportados sobre la línea celular HeLa (IC_{50} de HeLa de 1 mg/mL; *Hernández et al., 2017*), se obtuvo un menor valor, es decir, una mayor efectividad. Dicha mejora de la efectividad podría ser atribuida a las diferentes naturalezas de las células cancerosas comparadas, ya que, al tratarse de células en suspensión como las leucémicas, pueden ser más susceptibles al tratamiento que aquellas células formadoras de tumores (HeLa) donde dichos aglomerados representan un problema para la mayor eficacia del tratamiento.

La inhibición de la apoptosis es esencial en la carcinogénesis, ya que puede estar bloqueada en las células cancerosas y el conocimiento de las vías moleculares de este

proceso ha permitido desarrollar nuevos fármacos. Por lo tanto, se analizó el mecanismo de muerte celular que inducen los CDPs sobre este tipo de leucemia. Empleando concentraciones de 0.05 mg/mL de CDPs, donde se obtuvo un porcentaje de células apoptóticas de aproximadamente 80 %. En el comparativo con la vincristina, utilizado a concentración de 0.1 mg/mL, se obtuvo un porcentaje similar (79 %) de células apoptóticas. Con este resultado se reafirma que la dosis necesaria de tratamiento con CDPs para obtener un efecto similar al ejercido por la vincristina, se encuentra en cantidades 5 veces menores.

Con eso se demuestra claramente que el mecanismo de muerte celular que desencadenan los CDPs es la apoptosis, lo cual es concordante con reportes previos para las líneas celulares CaCo-2 (*Vázquez Rivera et al., 2014*), HeLa (*Hernández Padilla et al., 2017*) y B16-F0 (*Duran-Maldonado et al., 2020*). En 2020, bajo las mismas condiciones de concentración y tiempo de tratamiento, se reportó para la línea celular B16-F0 46.1 % de células apoptóticas a 0.05 mg/mL de CDPs (*Duran-Maldonado et al., 2020*) de modo que, se puede decir que, en este tipo de neoplasia no formadora de tumores, se obtuvo un mayor porcentaje de células apoptóticas en comparación con reportes pasados y un efecto similar al obtenido por la vincristina. La diferencia en el efecto entre este trabajo y los reportados con anterioridad pueden diferir en el porcentaje de células apoptóticas alcanzadas a concentraciones similares, debido a las células utilizadas, ya que a pesar de que comparten similitudes, también difieren en la forma de desarrollo, propagación y respuesta al tratamiento. Se puede ver que para el mantenimiento de las masas tumorales se adquiere

la habilidad de evadir la respuesta inmune, inducir la angiogénesis, ser capaces de volverse resistentes a la apoptosis y a las señales que reprimen su crecimiento (*Hanahan y Weinberg, 2011*)

El efecto apoptótico de los CDPs ha sido descrito con anterioridad y se ha demostrado las vías moleculares por las cuales se lleva a cabo. No obstante, es importante realizar comparativos con fármacos utilizados actualmente con la finalidad de evaluar la dosis terapéutica a la cual nuestros compuestos pueden presentar un efecto considerado como bueno en relación a los tratamientos actuales, aun y cuando el mecanismo de acción no sea el mismo ejercido por ambos tratamientos. En este caso se demostró una mejora en del efecto, la cual puede ser atribuible a las propias características estructurales de los CDPs, ya que, al ser moléculas pequeñas, con alta biodisponibilidad y con amplia capacidad de unión a diferentes receptores, las convierten en un buen compuesto de uso terapéutico.

La mayoría de medicamentos utilizados para tratar el cáncer son poco selectivos y presentan altos niveles de resistencia y toxicidad, afectando considerablemente el pronóstico de vida en pacientes con esta enfermedad. Dada su escasa selectividad con las células cancerosas, la vincristina suele provocar efectos secundarios no deseados, el más grave de los cuales es la neuropatía periférica. Por ello, este fármaco debe utilizarse en concentraciones más bajas y, por tanto, es más adecuada para la terapia combinada que para la monoterapia (*Škubník et al., 2021*).

Dicho lo anterior, con la finalidad de disminuir efectos secundarios que provocan los tratamientos actuales contra el cáncer, se evaluó el efecto que ejercen los CDPs sobre células sanas, utilizando los tratamientos con CDPs para tratar células mononucleares aisladas de sangre periférica de individuos sanos con la finalidad de descartar afectaciones a las mismas. Los resultados obtenidos en la viabilidad celular demuestran que no existe una reducción significativa para los tratamientos de 0.01 y 0.05 mg/mL de CDPs en comparación al control, no obstante, el tratamiento de 0.1 mg/mL demuestra una disminución de viabilidad de aproximadamente 10 %. Si bien este último resultado no es completamente el deseado, se logró observar que, a una dosis mucho menor, no se presenta disminución de la viabilidad y el efecto terapéutico se mantiene. Para las concentraciones 5 veces y 10 veces menor, se obtuvo como resultado un 3 % de células apoptóticas, lo cual coincide y reafirma lo reportado en 2017 (4 % de células mononucleares en apoptosis temprana; *Hernández et al., 2017*) a condiciones comparables de tiempo y concentración.

El hecho de presentar un porcentaje de disminución de la viabilidad de las células sanas a la concentración más alta de las utilizadas en este trabajo, podría estar indicando un posible límite superior de la ventana terapéutica para este tratamiento. Aunque el efecto citotóxico se mantiene a estas concentraciones, creemos que un aumento drástico en la dosis de CDPs puede representar una baja en la especificidad del tratamiento, así como repercusión a las células sanas. Además, respecto a los demás componentes celulares sanguíneos tales como eritrocitos y plaquetas, no se presentó porcentaje de células apoptóticas.

Para los excipientes destinados a medicamentos inyectables, debe realizarse un estudio de hemólisis in vitro a la concentración prevista para el intravenoso para determinar el potencial hemolítico (FDA, 2005). Por consiguiente, se realizó un ensayo de hemólisis para evaluar la hemocompatibilidad que presentan los CDPs a concentraciones de 0.05 mg/mL. El porcentaje de hemólisis obtenido fue de 4 %. De acuerdo con lo descrito en la

guía por Amin et al., 2006 donde se considera que las formulaciones con un valor de hemólisis <10 % no son hemolíticas, se pueden considerar a los tratamientos con CDPs a las concentraciones indicadas como compuestos no hemolíticos.

Por consiguiente, podemos proponer que los CDPs ejercen efecto anti cancerígeno en este tipo de neoplasia, y que por lo menos, a las concentraciones utilizadas en este trabajo, no produce efectos adversos en las células sanas, complementando lo reportado en 2020 donde se demostró que los CDPs no presentan afecciones sobre animales sanos en estudio de modelo murino (*Duran-Maldonado et al., 2020*). Estos resultados son destacables y de suma importancia en cuanto al diseño de las terapias anti-cáncer, debido a la producción de efectos adversos que conllevan las terapias convencionales.

La mayoría de los niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) se curan con los planes de terapia de primera línea actuales. Sin embargo, en el 15 a 20 % de los casos en los Estados Unidos, la LLA regresa. El regreso del cáncer se denomina recaída o recurrencia, teniendo un porcentaje de supervivencia entre el 30 % y el 50 % de los pacientes (*Hospital infantil St. Jude, 2018*).

Por lo tanto, se suele considerar a los pacientes con LLA en condición de recaída con pronósticos desalentadores, con una baja supervivencia, y con limitadas opciones de tratamiento como a la quimioterapia citotóxica convencional con una actividad mínima. Debido a esto, se busca avanzar rápidamente en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas que puedan mejorar significativamente los resultados en la leucemia recurrente. Por consiguiente, se optó por evaluar el efecto citotóxico que pueden ejercer los CDPs sobre las muestras de pacientes con carácter de recaída, donde se observó que a 12 horas de tratamiento y a concentraciones máximas de 0.1 mg/mL de CDPs la viabilidad celular disminuyó apenas 7 % en comparación con las células sin tratamiento, obteniendo un efecto similar al ejercido por la vincristina a la misma concentración. Así mismo, en busca de mejores resultados, se prolongó el tiempo de exposición al tratamiento hasta 24 horas empleando concentraciones desde 0.01 hasta 1 mg/mL de CDPs, resultado en el cual se pudo observar una disminución de la viabilidad celular cercana al 40 %, mientras que para la vincristina a 0.1 mg/mL se observó una disminución de viabilidad celular de 17 %.

El porcentaje de células apoptóticas para los tratamientos con CDPs y vincristina representaron apenas 11 % y 5 % respectivamente, observando una disminución considerable en comparación a las muestras de pacientes no recurrentes.

Comparando estos resultados, se puede observar que, a tiempos largos de exposición, los CDPs logran un efecto citotóxico más efectivo al ejercido por la vincristina,

dicho efecto empleando incluso una concentración de CDPs 10 veces menor a la del fármaco. Aunque los CDPs demostraron un efecto similar a la vincristina, bajo estas condiciones ambos tratamientos reducen considerablemente su efectividad. Esta disminución de citotoxicidad es atribuida al tipo de muestra tratada, ya que, la baja especificidad de los tratamientos terapéuticos actuales hacia algunos tipos de cáncer se ve reflejada en la rápida generación de resistencia a los medicamentos. Esto puede ser un desafío al momento de tratarla, ya que es posible que los pacientes requieran quimioterapia agresiva.

De modo que, a pesar de la especificidad y efectividad mostrada hasta ahora por los CDPs, para estos casos, no se puede garantizar la eficacia de una monoterapia con estos compuestos, aunque creemos que una terapia combinada puede resultar más adecuada y más efectiva para intentar lograr la remisión.

Resumiendo, los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con lo reportado anteriormente en nuestro grupo de trabajo, en relación a la citotoxicidad que poseen los CDPs sobre células cancerosas, así como el proceso apoptótico que desencadenan, pudiendo presentar variaciones en cuanto a la efectividad que presentan sobre distintas líneas celulares, pero del mismo modo, teniendo la certeza de que el tratamiento cumple su cometido sobre una variedad de características y comportamientos celulares.

La relevancia de los resultados de este trabajo, está relacionada además del mecanismo citotóxico descrito, con la selectividad que este posee, al no repercutir sobre el resto de los componentes celulares de las muestras de pacientes con leucemia y de igual manera, no generar daño en ningún tipo de células sanguíneas sanas, además, los CDPs no son generadores de efecto hemolítico.

Es destacable entonces, la importancia de trabajar con este tipo de muestras en ensayos pre clínicos, porque, aunque proporcionan mucha información útil acerca del medicamento en desarrollo, no proporcionan todo lo que es necesario saber. Humanos y ratones poseen diferentes formas de absorber, procesar y desechar medicamentos, por lo que, un tratamiento que funciona contra un cáncer en ratón, puede que no funcione en personas o pueden ser generadores de efectos secundarios y otros problemas que no se presentaron cuando el tratamiento se usó en ratones.

Si bien es cierto que los CDPs son interesantes a nivel farmacológico debido a que han demostrado hasta ahora su efectividad, especificidad de blanco y baja toxicidad, generan la seguridad de poder ser usados como compuestos terapéuticos frente a distintos

tipos de cáncer, sin afecciones a células sanas en estos ensayos pre clínicos, así como sin signos evidentes de toxicidad en cambios macro y microscópicos en diferentes órganos evaluados en modelo in vivo, aún queda mucho por investigar antes de ser administrados como tratamiento directo a pacientes que padecen esta enfermedad. El avance ha sido significativo y puede ser utilizado como precedente para futuras investigaciones de ensayos clínicos con terapia dirigida o combinada, en las cuales se busca un enfoque más eficaz y centrado en el paciente, que permita mejorar significativamente los resultados, evitando efectos secundarios y que proporcionen mejores opciones de tratamiento y un mejor pronóstico.

11. CONCLUSIÓN

Los ciclodipéptidos; ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Phe) producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ejercen un efecto citotóxico mediante la inducción selectiva de apoptosis sobre muestras neoplásicas de pacientes diagnosticados con leucemia.

12. REFERENCIAS

American Cancer Society. Quimioterapia para la leucemia en niños. 2019. Disponible en línea: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-en-ninos/tratamiento/quimioterapia.html>

Amin, K., Dannenfelser, R. (2006). In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. *Journal of Pharmaceutical Science*, 95(6), 1173-6. doi:10.1002/jps.20627. PMID: 16639718.

Barrera, R., Peralta, O., Madrid, V. (1995). Bases moleculares de la inmunología del cáncer. *J Salud Pública de México*, 37(4).

Begum, S., Hira, K., Shaik, A., Pal, P., Kulkarni, O., Araya, H. (2019). L-Proline-based-cyclic dipeptides from *Pseudomonas* sp. (ABS-36) inhibit pro-inflammatory cytokines and alleviate crystal-induced renal injury in mice. *International Immunopharmacology*, 73, 395-404.

Bergom, C., Gao, C., & Newman, P. J. (2005). Mechanisms of PECAM-1-mediated cytoprotection and implications for cancer cell survival. *Leukemia & Lymphoma*, 46(10), 1409-1421.

Borthwick, D. (2012). 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chemical Reviews*, 112(7), 3641-716.

Brauns, C., Dealtry, G., Milne, P., Naudé, R., Van, M. (2005). Caspase-3 activation and induction of PARP cleavage by cyclic dipeptide cyclo(Phe-Pro) in HT-29 cells. *Anticancer research*, 25(6b), 4197-202.

Budesinsky, M., Cisarova, I., Podlaha, J., Borremans, F., Martins, C., Waroquier, M. (2010). Structures of cyclic dipeptides: an X-ray and computational study of cis- and trans-cyclo(Pip-Phe), cyclo(Pro-Phe) and their N-methyl derivatives. *Acta Crystallographica Section B*. 66(6), 662-77.

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

Dai, L., Qian, G., Wei, Z., Hong, L., Yu, F., Tian, Z. (2005). Antitumor components from marine actinomycete 11014: I. Cyclic dipeptides. *Chinese Journal of Antibiotics*, 30(8), 449-68.

Durán, X., Hernández, L., Gallardo, C., Díaz, L., Martínez, L., Reyes, H., Pacheco, G., Moss, J., Campos, J. (2020). Bacterial cyclodipeptides target signal pathways involved in malignant melanoma. *Frontiers in Oncology*, 10(1111), DOI: 10.3389/fonc.2020.01111.

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

Evans, C., Nelson, E., Yu, S., Beavers, R., Kim, J., Li, H., Nelson, M., Giorgio, D., Duvall, L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of Visualized Experiments*, 9(73), 50-166. doi: 10.3791/50166. PMID: 23524982; PMCID: PMC3626231.

FDA Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients 2005. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nonclinical-studies-safety-evaluation-pharmaceutical-excipients>

Finking, R., Marahiel, A. (2004). Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annual review microbiology*, 58(1), 453-88.

Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nature Chemical Biology*, 5(6), 414-20.

González, O., Ortíz, R., Díaz, C., Díaz, L., Magaña, V., López, J., Campos, J. (2017). Non-ribosomal peptide synthases from *Pseudomonas aeruginosa* play a role in cyclodipeptide biosynthesis, quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. *Microbial ecology*, 73(3), 616-629.

Guri, Y., Colombi, M., Dazert, E., Hindupur, S. K., Roszik, J., Moes, S., & Hall, M. N. (2017). mTORC2 promotes tumorigenesis via lipid synthesis. *Cancer cell*, 32(6), 807-823.

Hanahan, D., Weinberg, A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 44(5), 646-74.

Hernández, L., Vázquez, D., Sánchez, A., Díaz, L., Moreno, J., Moreno, A., Campos, J. (2017). The Antiproliferative Effect of Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa Cells Involves Inhibition of Phosphorylation of Akt and S6k Kinases. *Molecules*, 22(6), 1024.

Hernández, L., Reyes, H., Campos, J. (2020). Antiproliferative effect of bacterial cyclodipeptides in the HeLa line of human cervical cancer reveals multiple protein kinase targeting, including mTORC1/C2 complex inhibition in a TSC1/2-dependent manner. *Apoptosis*, 25(24).

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

Kawata, T., Tada, K., Kobayashi, M., Sakamoto, T., Takiuchi, Y., Iwai, F., & Sato, H. (2018). Dual inhibition of the mTORC 1 and mTORC 2 signaling pathways is a promising therapeutic target for adult T-cell leukemia. *Cancer science*, 109(1), 103-111.

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

Li, X., Commane, M., Jiang, Z., Stark, R. (2001). IL-1-induced NF κ B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4461-5.

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

Mehnaz, S., Saleem, Z., Yameen, B., Pianet, I., Schnakenburg, G., Pietraszkiewicz, H. (2013). Lahorenoic Acids A–C, ortho-Dialkyl-Substituted Aromatic Acids from the Biocontrol Strain *Pseudomonas aurantiaca* PB-St2. *Journal of Natural Products*, 76(2), 135-41.

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

Mollica. A., Costante, R., Fiorito, S., Genovese, S., Stefanucci, A., Mathieu, V. (2014). Synthesis and anti-cancer activity of naturally occurring 2,5-diketopiperazines. *Fitoterapia*, 7, 98:91.

NIH. What Is Cancer? 2020 [Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

Nishanth, S., Dileep, C., Mohandas, C., Nambisan, B., Ca, J. (2014). Cyclo(d-Tyr-d-Phe): a new antibacterial, anticancer, and antioxidant cyclic dipeptide from *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Journal of Peptide Science*, 20(3), 173-85.

OMS. Cancer 2020 [Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Prasad, C. (1995). Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, 16(1), 151-64.

Ressurreição, M., Delatouche, R., Gennari, C., Piarulli, U. (2011). Bifunctional 2,5-Diketopiperazines as Rigid Three-Dimensional Scaffolds in Receptors and Peptidomimetics. *European journal of organic chemistry*, (2), 217-28.

Škubník J, Pavlíčková VS, Ruml T, Rimpelová S. (2021). Vincristine in Combination Therapy of Cancer: Emerging Trends in Clinics. *Biology (Basel)*. 10(9):849. doi: 10.3390

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

St. Jude Children's Research Hospital. La neuropatía periférica después de la quimioterapia. 2018. Disponible en línea: <https://together.stjude.org/es-us/diagn%C3%B3stico-tratamiento/efectos-secundarios/neuropat%C3%ADa-perif%C3%A9rica.html>

Types of leukemia: Cancer Treatment Centers of America; [Available from: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/leukemia/types>].

Vázquez, D., González, O., Guzmán, J., Díaz, L., Ochoa, A., López, J., Meza, V., Campos, J. (2015). Cytotoxicity of Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Leads to Apoptosis in Human Cancer Cell Lines. *BioMed Research International*, 197608, doi: 10.1155/2015/197608.

Wei, X., Fang, W., Xie, X., Zhang, P., Jiang, Y., Wu, H. (2017). Secondary Metabolites of a Soil-Derived *Streptomyces kunmingensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(4), 794-6.

What Are the Different Types of Leukemia? Stanford Health Care; [Available from: <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/cancer/leukemia/types.html>].

What is leukemia? Canadian Cancer Society; [Available from: <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/leukemia/leukemia/?region=on>].

13. ANEXOS

13.1. Protocolo de investigación “Efecto de ciclodipeptidos bacterianos en células sanguíneas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda del Hospital Infantil de Morelia



Instituto de Investigaciones Químico biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Hospital Infantil de Morelia
“Eva Sámano de López Mateos”

Protocolo de Investigación

Efecto de ciclodipeptidos bacterianos en células sanguíneas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda del Hospital Infantil de Morelia.

Autores

Dr. C.Q. Homero Reyes de la Cruz

Dr. C.Q. Jesús Campos García

Dr. Eloy Pérez Rivera

Dra. Silvia Chávez Gallegos

Dr. Francisco Vargas Saucedo

Q.F.B. Héctor Antonio Kido Díaz

Morelia, Michoacán agosto 2021

13.2 Artículo “Bacterial cyclodipeptides elicit *Arabidopsis thaliana* immune responses reducing the pathogenic effects of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains on plant development”

Journal of Plant Physiology 275 (2022) 153738



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jplph



Bacterial cyclodipeptides elicit *Arabidopsis thaliana* immune responses reducing the pathogenic effects of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains on plant development

Cristhian Said Solis-Ortiz^a, Javier Gonzalez-Bernal^a, Héctor Antonio Kido-Díaz^a, Cesar Artuto Peña-Urbe^a, Jesús Salvador López-Bucio^a, José López-Bucio^b, Ángel Arturo Guevara-García^c, Ernesto García-Pineda^d, Javier Villegas^e, Jesús Campos-García^{f,**}, Homero Reyes de La Cruz^{a,*}

^a Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, Mexico

^b Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, Mexico

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62250, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^d Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, Mexico

^e Laboratorio de Interacción Suelo-Planta-Microorganismo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, Mexico

^f Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030, Morelia, Michoacán, Mexico