



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Laboratorio de Biotecnología experimental

TITULO DE TESIS:

**“Evaluación del efecto antitumoral de ciclodipéptidos producidos por
Pseudomonas aeruginosa PAO1 en modelo *in vivo* de melanoma murino”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL PRESENTA:**

Q.F.B. Mayra Xochitl Durán Maldonado

ASESOR DE TESIS:

D.C. Jesús Campos García

Morelia, Michoacán. Agosto, 2018.

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Cáncer	7
Cáncer de piel.....	8
1.1.1. Tumores que no son melanomas.....	8
1.1.2. Melanoma	8
1.1.3. Aspectos moleculares del cáncer	10
1.1.4. Características distintivas del cáncer	11
1.1.5. Marcadores tumorales	13
1.1.6. Lactato deshidrogenasa como marcador tumoral en melanoma.....	14
1.1.7. Tratamientos convencionales contra el cáncer	14
La cirugía	15
Radioterapia	15
Quimioterapia	15
Inmunoterapia.....	16
1.1.8. Ciclodipeptidos como moléculas con potencial anticancerígeno	16
2. ANTECEDENTES	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVO GENERAL	21
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Células B16/F0.....	21
6.1.1. Verificación de viabilidad de la suspensión de células B16F/0	22
6.1.2. Ensayo de viabilidad celular en células B16/F0 por reducción de MTT	22
6.1.3. Ensayo de muerte celular por citometría de flujo	23
6.2. Obtención de los ciclodipeptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	24
6.3. Cepa de ratones C57BL/6	24
6.3.1. Grupos de ratones.....	24
6.3.2. Preparación de la suspensión celular para la inoculación de ratones	25
6.3.3. Inducción de los tumores con células B16/F0.....	25
6.4. Tratamiento con la mezcla de ciclodipeptidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	26
6.5. Monitoreo de volumen tumoral	26
6.6. Sacrificio de los ratones y extracción de muestras biológicas.....	26
6.7. Muestras de sangre.....	26
6.7.1. Determinación de hematocrito.....	27
6.7.2. Determinación de hemoglobina.....	27

6.7.3.	Conteo diferencial de leucocitos.....	27
6.7.4.	Detección de las enzimas plasmáticas lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).....	28
6.7.5.	Tumores y órganos.....	28
6.7.6.	Histología de tumores y órganos.....	28
6.7.7.	Detección de proteínas de fenotipo canceroso en melanoma por micro arreglo....	30
7.	RESULTADOS	30
7.1.	Efecto de la mezcla de ciclodipeptidos en la viabilidad de la línea celular B16/F0... 30	
7.2.	Efecto de los ciclodipeptidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en el peso de ratones C57BL6 inducidos con melanoma.	31
7.3.	Evaluación del efecto de los CDPs en el volumen tumoral.....	33
7.4.	Evaluación de parámetros sanguíneos en ratones inducidos con melanoma y tratados con los ciclodipeptidos.	34
7.5.	Efecto de los ciclodipeptidos en el peso de tumores y órganos de los ratones C57BL/6... 36	
7.6.	Evaluación de los niveles séricos de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) como marcadores de función hepática y lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador tumoral en ratones con melanoma y tratados con ciclodipeptidos.....	37
7.7.	Análisis histológico de melanomas y órganos de ratones tratados con los ciclodipeptidos.	38
7.8.	Efecto de los ciclodipeptidos sobre la expresión de proteínas que participan en vías de señalización que favorecen el desarrollo del tumor.....	40
8.	DISCUSIÓN	41
9.	CONCLUSIÓN	47
	BIBLIOGRAFÍA	48

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.	Generación de un melanoma.....	10
Figura 2.	Genes supresores de tumores y proto-oncogenes en el desarrollo del cáncer.....	11
Figura 3.	Las características distintivas del cáncer como posibles blancos terapéuticos	13
Figura 4.	Estructura general de los ciclodipeptidos ó 2,5-dicetopiperazinas..	17
Figura 5.	Efecto citotóxico de los CDPs en células cancerosas.	19
Figura 6.	Inducción de apoptosis en células HeLa por lo ciclodipeptidos producidos por <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	20
Figura 7.	Efecto de los ciclodipeptidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en la expresión y fosforilación de Akt en células HeLa.....	20

Figura 8. Microfotografía de células de melanoma murino B16/F0 en cultivo	22
Figura 9. Fotografía de ratones a los 10 días de ser implantados con células de melanoma B16/F0.	26
Figura 10. Efecto de los PAO1-CDPs en la viabilidad celular e inducción de apoptosis en células B16 de melanoma..	31
Figura 11. Registro de peso de los ratones C57BL/6 y volumen tumoral durante el tratamiento con CDPs..	32
Figura 12. Parámetros hematológicos de ratones con melanoma..	33
Figura 13. Morfología de células sanguíneas de ratones inducidos con melanoma..	35
Figura 14. Peso de los tumores al término del tratamiento con CDPs. s.....	36
Figura 15. Marcadores de función hepática y marcador tumoral en ratones con melanoma.	37
Figura 16. Peso de los órganos de ratones inducidos con melanoma..	38
Figura 17. Histología de tumores de ratones tratados con los ciclodipéptidos.....	40
Figura 18. Histología de los órganos de ratones inducidos con melanoma y tratados con los CDPs..	40
Figura 19. Efecto de los CDPs en la expresión de proteínas de vías involucradas en el fenotipo canceroso.	41
Figura 20. Mecanismo de los CDPs para producir un efecto antiproliferativo en un modelo <i>in vivo</i> de melanoma murino.....	47

RESUMEN

El cáncer es un término genérico que se refiere a decenas de enfermedades que afectan a tejidos y tipos celulares caracterizadas por una proliferación celular descontrolada. El cáncer es un problema de salud pública pues en los últimos años se han registrado más 8.2 millones de muertes en el mundo; en México es la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardíacas y la diabetes. A pesar de que en la actualidad existe una amplia gama de tratamientos contra el cáncer aprobados por instancias de salud, sigue existiendo el interés por encontrar terapias específicas que disminuyan los efectos secundarios y la quimio-resistencia de las células tumorales a los fármacos. El melanoma es uno de los tipos de cáncer de mayor prevalencia, y aunque puede ser curable cuando es detectado en etapas tempranas, suele ser muy agresivo, de rápido avance y frecuentemente presenta resistencia a quimioterapéuticos. Los ciclodipéptidos (CDPs) son un tipo de moléculas producidas por una gran diversidad de organismos y con una extensa lista de actividades biológicas que van desde tener efecto antimicrobiano hasta presentar efecto promotor de crecimiento en plantas. En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que los CDPs producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) inducen muerte celular por apoptosis a través de la inhibición de la fosforilación de la vía PI3K/Akt/mTOR en las líneas celulares humanas de cáncer Hela y CaCo-2. La finalidad de este trabajo fue evaluar el efecto anti-tumoral de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1-CDPs) en un modelo *in vivo* de cáncer. Los resultados indicaron una disminución de hasta el 50% en el tamaño de los tumores implantados en ratones C57BL/6 inducidos con la línea celular B6F/0 de melanoma, animales que fueron administrados con los PAO1-CDPs. Los valores sanguíneos del marcador tumoral lactato deshidrogenasa (LDH) fueron significativamente menores en los ratones sujetos al tratamiento. Adicionalmente, valores plasmáticos de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), así como del peso de los órganos y su histología, mostraron que los PAO1-CDPs actúan selectivamente sobre células tumorales sin ocasionar daño celular o funcional en otros tejidos. Análisis mediante Western blot de los extractos procedentes de tumores inducidos en ratones sin tratamiento mostraron incremento en la expresión de PCNA, p27kip1, Survivina, N-cadherina y HIF1 α , proteínas que participan en los mecanismos de control de tumorigénesis. En el caso de los grupos de animales tratados con los PAO1-CDPs se observó una disminución significativa en la expresión de dichas proteínas. En conclusión, los resultados indican que los PAO1-CDPs inducen citotoxicidad en la línea B6F/0 de melanoma murino, la administración de PAO1-CDPs disminuyó el volumen tumoral en el modelo de implantación de tumores en ratón, así como del marcador tumoral LDH. Finalmente, los resultados correlacionaron con la disminución de los niveles de expresión de las proteínas involucradas en el control de la tumorigénesis, comprobando así las propiedades anti-tumorigénicas de los PAO1-CDPs.

ABSTRACT

Cancer is a generic term that refers to dozens of diseases that affect tissues and cell types characterized by uncontrolled cell proliferation. Cancer is a public health problem because in recent years are registered more than 8.2 million deaths in the world; in Mexico it is the third cause of death later of heart disease and diabetes. Although there is currently a wide range of cancer treatments approved by health agencies, there is still interest in to find specific therapies that reduce collateral effects and chemo-resistance of tumor cells to drugs. Melanoma is one of the most prevalent types of cancer, and although it can be curable when it is detected in early stages, it is usually very aggressive, rapidly advancing and frequently shows resistance to chemotherapy. Cyclodipeptides (CDPs) are a type of molecules produced by a great diversity of organisms and with an extensive list of biological activities such as antimicrobial effect as growth promoting effect on plants. In our research group it was shown that the CDPs produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val) and cyclo(L-Pro-L-Phe) induce death cell by apoptosis through the inhibition of phosphorylation in the PI3K/Akt/mTOR pathway on HeLa and CaCo-2 human cancer cell lines. The purpose of this work was to evaluate the antitumor effect of CDPs of *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1-CDPs) in an *in vivo* model of cancer. The results indicated a decrease up to 50% in the size of the tumors implanted in C57BL/6 mice induced with the melanoma B16F/0 cell line, animals that were administered with the PAO1-CDPs. The blood values of the tumor marker lactate dehydrogenase (LDH) were significantly lower in the mice subjected to the treatment. Additionally, plasmatic values of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), as well as the weight of the organs and their histology, showed that the PAO1-CDPs selectively act on tumor cells without causing cellular or functional damage in other tissues. Western blot analysis of extracts from tumors induced in mice without treatment showed increased expression of PCNA, p27kip1, Survivin, N-cadherin and HIF1 α , proteins that participate in the mechanisms of tumorigenesis control. In the animals group treated with the PAO1-CDPs was showed a significant decrease in the expression of these proteins. In conclusion, the results indicate that the PAO1-CDPs induced cytotoxicity in the B6F/0 line of murine melanoma, the administration of PAO1-CDPs decreased the tumor volume in the tumor implantation mouse model, as well as the LDH tumor marker. Finally, the results obtained correlated with the decreased expression levels of the proteins involved in the control of cancer, confirming the anti-tumorigenesis properties of the PAO1-CDPs.

PALABRAS CLAVE: *Pseudomonas aeruginosa*, ciclodipéptidos, antiproliferativo, melanoma, cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

Es un término genérico que se refiere a decenas de enfermedades que afectan a muchos tejidos y tipos celulares caracterizadas por una proliferación descontrolada (Hoskin y Ramamoorthy, 2008). Es un padecimiento multifactorial, donde las causas de su desarrollo van desde factores ambientales, agentes infecciosos como virus y bacterias, hábitos de vida e incluso historia familiar de incidencia de ciertos tipos de cáncer. Hasta hace algunos años se pensaba que el origen del cáncer se debía exclusivamente al factor genético, que implica mutación de genes importantes para mantener el equilibrio entre división y muerte celular; sin embargo ahora se sabe que también puede originarse por factores epigenéticos que consisten en cambios reversibles y heredables en la regulación génica que ocurren sin un cambio en la secuencia del ADN, dichos cambios pueden ser ARNs de interferencia (iARNs), metilación del ADN y modificación de histonas (Meng et al., 2012).

Es importante destacar que no todos los tumores dan origen a la enfermedad de cáncer. Las neoplasias pueden catalogarse en benignas y malignas diferenciándose principalmente en su comportamiento biológico. En las neoplasias benignas las células suelen dividirse lentamente y ser similares a las normales, los tejidos mantienen su arquitectura y el tumor está restringido a la zona donde se inició su proliferación, manteniendo un límite definido con los tejidos que lo rodean. Esta característica es tal vez la más importante, puesto que los tumores benignos no son capaces de diseminarse a otros sitios del organismo. Por su parte, las neoplasias malignas o cancerosas, están constituidas por células que tienden a perder su diferenciación y que se dividen rápidamente o de manera errática. Tienen la capacidad de infiltrar e invadir tejidos sanos cercanos, y eventualmente dispersarse en el organismo a través del sistema circulatorio o linfático para dar origen a la formación de focos secundarios de implantación o metástasis (Segatori, 2014).

La frecuencia de los diversos tipos de cáncer varía según el sexo, aproximadamente el 30% de las defunciones por cáncer son prevenibles; también se reportó que el consumo del tabaco es el principal factor de riesgo de cáncer. Otros factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad son contaminantes en el ambiente, exposición a la luz UV y otras radiaciones.

Las estadísticas recientes según la Organización Mundial de la Salud (OMS), revelan que el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial y es la tercera causa de muerte en México (por enfermedades no infecciosas) solo después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus. En los últimos años se han registrado más de 8.2 millones de muertes en el mundo y se pronostica que las muertes debidas al cáncer a nivel mundial sigan aumentando, calculando que serán 12 millones para el año 2030.

El cáncer en la actualidad comprende más de 100 tipos y cada uno de ellos presentan diferentes características patológicas y comportamiento, esto sumado a que la inestabilidad genética de las células tumorales genera un fenotipo muy cambiante incluso dentro de un mismo tumor, hace difícil el comprender los eventos moleculares claves para la supervivencia de las células malignas y la identificación de los blancos moleculares para la generación de fármacos anti-cáncer que sean eficaces para los cánceres de difícil tratamiento. Los tipos de cáncer de mayor prevalencia sin distinguir sexo y/o edad, son el cáncer de próstata, de mama, cérvico-uterino, leucemias, pulmón, hígado, tiroides, cavidad oral, pulmón, riñón, vejiga y cáncer de piel (melanoma) (www.cancer.gov, National Cancer Institute, NCI).

Cáncer de piel

Los tipos de cáncer de piel más comunes surgen de las células de la epidermis, se clasifican en dos grupos:

1.1.1. Tumores que no son melanomas

Este grupo está constituido a su vez por el **carcinoma basocelular** originado en células basales generando una neoplasia epitelial maligna local, con localización preferentemente centrofacial, caracterizada por lesiones polimorfas bien limitadas con un borde acordonado, muchas veces pigmentadas, de crecimiento lento; casi nunca genera metástasis; y el **carcinoma espinocelular o epidermoide**, una neoplasia cutánea maligna, derivada de las células de la epidermis o sus anexos; se caracteriza por lesiones vegetantes, verrugosas o ulceradas que predominan en cabeza y extremidades, de crecimiento rápido, y que pueden establecer metástasis en ganglios regionales y otros órganos.

1.1.2. Melanoma

Melanoma es el nombre genérico de los tumores melánicos o pigmentados. Generalmente, un melanoma se refiere a un tumor cutáneo que se desarrolla a partir de los melanocitos epidérmicos (90% de los cánceres de piel), aunque también se puede identificar en el ojo (9%) y epitelio de mucosas (1%) (Hussein, 2008). Es una neoplasia pigmentada, plana o exofítica de naturaleza muy agresiva, y aunque en algunos casos se puede dar la regresión del tumor primario e incluso a metástasis (Avinoach y Aflalo, 1992). En general, una vez diseminado, es prácticamente incurable (Denninghoff et al., 2006). En los últimos 50 años el melanoma ha mostrado un alarmante incremento a nivel mundial y a pesar de que este solo representa el 10% de todos los cánceres de piel, es responsable del 80% de las muertes (Houghton y Polsky, 2002).

Una de las características fundamentales de esta patología tumoral es su localización superficial, este hecho junto con la presencia del pigmento melánico, permiten observar y estudiar directamente la progresión tumoral del melanoma. Ambas características han

permitido definir con bastante precisión una serie de etapas fundamentales que tienen lugar en el desarrollo del melanoma humano (Clark et al., 1984), que constituyen la base del diagnóstico objetivo del estudio del tumor y el pronóstico de riesgo. A pesar de representar menos del 5% de los tumores de piel, el melanoma es el tipo de neoplasia que más ha incrementado su incidencia en las últimas décadas, especialmente en la población caucásica cercana a los trópicos o el Ecuador, siendo responsable de casi el 90% de las muertes producidas por los tumores cutáneos malignos. (Narayanan et al., 2010; Kanavy y Gerstenblith, 2011).

El desarrollo de un melanoma depende de múltiples factores, tanto genéticos como ambientales; entre los genéticos se incluye la historia familiar centrada en el desarrollo de enfermedades cancerígenas y el número de lunares por cm³ de piel, destacando que a mayor cantidad de lunares mayor es el riesgo de generar melanoma. Entre los factores ambientales, uno de los más relevantes en la actualidad, es la exposición a la radiación ultravioleta (Gray-Schopfer et al., 2007; Lin y Fisher, 2007; White y Zon, 2008).

La generación de un melanoma maligno comprende un conjunto de lesiones graduales que comienzan en un benigno hasta finalizar en un melanoma metastásico. Debido a que los melanocitos tienen la capacidad única de producir melanina, la proliferación de un melanoma resulta evidente, permitiendo también el seguimiento de las lesiones formadas. Esta característica permitió establecer seis estadios durante la transformación maligna de los melanocitos:

1. Adquisición de un nevo melanocítico común.
2. Nevo melanocítico con hiperplasia.
3. Nevo melanocítico con diferenciación aberrante y estructura nuclear atípica, displasia de melanocitos.
4. Fase de crecimiento radial del melanoma primario.
5. Fase de crecimiento vertical del melanoma primario.
6. Melanoma metastásico.

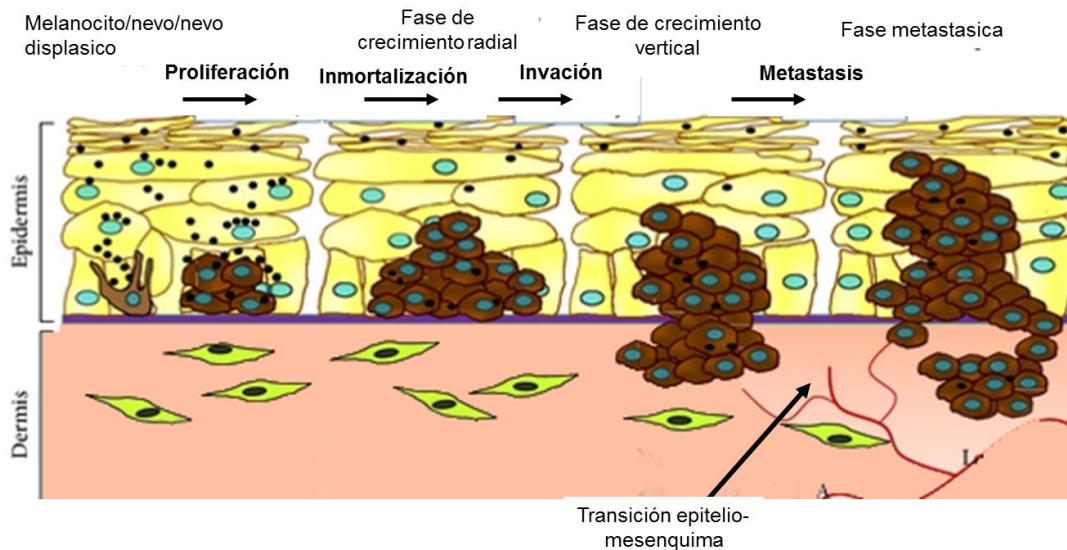


Figura 1. Generación de un melanoma. La formación de un melanoma inicia con la aparición de un nevo displásico por la transformación de un meloncito en célula cancerosa, las células transformadas proliferan rápidamente durante el crecimiento radial y posteriormente pasan al crecimiento vertical donde atraviesan la membrana basal e invaden capas más profundas de la piel, finalmente adquieren un fenotipo metastásico mediante la transición de epitelio a mesénquima (MET) que le permitirá a las células del tumor primario traspasar a la sangre e invadir tejidos distantes

El mecanismo molecular de la formación de los melanomas humanos cutáneos involucra la mutación de oncogenes, como Ras o BRAf, y la pérdida de función de genes supresores de tumores como E-cadherina (Margineanu et al., 2008; Wu et al., 2008), y p53 (Gray-Shopfer et al., 2007). Además, se ha asociado al desarrollo de un fenotipo de mayor potencial maligno cuando se induce la expresión de proteínas promotoras de metástasis como N-cadherina (Qi et al., 2005; Gray-Shopfer et al., 2007; Bennett, 2008), la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Larue y Delmas, 2006; 2009) o se pierde la expresión de Caveolina-1 (Trimmer et al., 2010).

1.1.3. Aspectos moleculares del cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja cuyas bases moleculares se establecen en el ciclo celular, el cual al verse desregulado por mutaciones en proteínas importantes que constituyen los diferentes puntos de control.

Se pueden destacar dos grupos de genes, de manera general, que participan en la conversión de la célula en un fenotipo canceroso, dichos grupos son los genes supresores de tumores, cuyos productos se encargan de detectar daños o anomalías en el ADN y detener el ciclo celular hasta que estos sean reparados, los cuales trabajan en conjunto con productos de genes reparadores de daño. El segundo grupo lo constituyen los proto-oncogenes, los cuales participan en vías de crecimiento, proliferación y supervivencia celular, y que en las células malignas se encuentran sobre-expresados. Un desequilibrio en

la expresión d estos grupos de genes da como resultado diversas características que le permiten a las células cancerosas dividirse descontroladamente y resistir a la muerte celular, entre otras. Mutaciones en ambos tipos de genes, junto a modificaciones en el nivel de expresión de ellos (regulación epigenética) llevan a la transformación de una célula normal en una maligna (Cooper y Hausman, 2010; Weinberg, 1989).

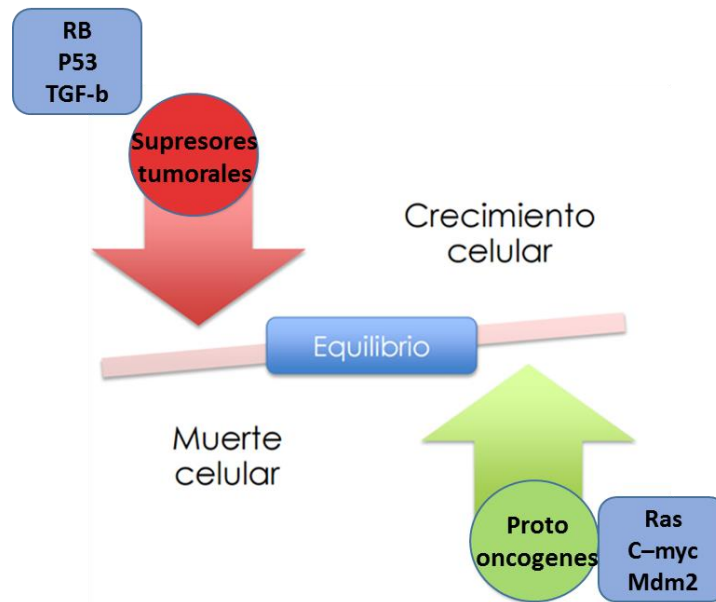


Figura 2. Genes supresores de tumores y proto-oncogenes en el desarrollo del cáncer. Modificado de Cooper y Hausman, 2010.

1.1.4. Características distintivas del cáncer

Hanagan y Weinberg en 2011 realizaron una revisión que agrupa las características consideradas como marcadores principales en cáncer, es decir, procesos que se ven afectados en las células tumorales independientemente del tipo de cáncer y que ayudan a la célula a proliferar, resistir a los procesos de muerte e invadir nuevos tejidos. Algunas de las características distintivas del cáncer se mencionan a continuación (Figura 3):

Mantienen la señalización proliferativa. Las células cancerosas pueden tener mutaciones en genes que activan vías de señalización de división y crecimiento celular, lo cual provoca que estas vías estén constantemente encendidas o que las señales que detienen los procesos proliferativos (evasión de supresores de crecimiento) no sean correctamente reconocidos haciendo posible la **inmortalidad replicativa**.

Des-regulación del metabolismo energético. El crecimiento excesivo del tumor provoca que las células más profundas no tengan acceso a la obtención de oxígeno lo cual debería provocar que estas células fueran muriendo paulatinamente, esto puede llegar a ocurrir,

pero solo en un pequeño porcentaje de las células. La mayoría de las células tumorales realizan un cambio en su metabolismo, siendo capaces de obtener energía a través de glucólisis anaeróbica, conocido como efecto Warburg, que pese a tener cierta desventaja energéticamente hablando, las provee de otras características que le ayudan a sobrevivir, por ejemplo, cambios en el pH que crean un microambiente tumoral óptimo para la **activación de genes pro-metastásicos** (Li et al., 2016).

Inducción de la angiogénesis. Para tener accesos a nutrientes y oxigenación, las células activan mecanismos que favorecen la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes mediante la liberación de interleucinas o factores de crecimiento.

Evasión del sistema inmune. De manera natural el sistema inmune continuamente elimina células dañadas o malignas, evitando que estas se sigan dividiendo y generen una población de células con importante acumulación de mutaciones y alta inestabilidad genética. Cuando una célula maligna tiene mutaciones en moléculas de superficie celular, puede pasar desapercibida por las células del sistema inmune evitando ser neutralizada. Sin embargo, se sabe que el sistema inmune puede tener un papel dual en el desarrollo de tumores, pues la persistencia de la respuesta inflamatoria de manera crónica favorece la activación de vías de supervivencia celular, además de que el microambiente pro-inflamatorio aporta interleucinas y factores de crecimiento que favorecen el desarrollo del tumor.

Resistencia a la muerte celular. Para mantener la homeostasis celular se cuenta con diferentes mecanismos regulatorios, entre ellos vías de muerte celular programada tales como la apoptosis, que es un proceso que ocurre cuando las células requieren recambio o cuando hay daño al ADN para evitar una progenie celular defectuosa. Una sobre activación de vías de supervivencia o mal funcionamiento de proteínas que inhiben estas vías o activan la apoptosis evitan que las células mueran haciendo difícil controlar la proliferación.

Invasión y metástasis. Tal vez la característica que más distingue una neoplasia maligna de una benigna en un estado avanzado del cáncer es la invasividad. Las células sufren cambios fenotípicos que le permiten transfundir a la sangre y albergarse en nuevos tejidos. La transición de epitelio a mesénquima (EMT), si bien es fundamental durante el desarrollo embrionario, durante el cáncer participa en la pérdida de las uniones adherentes (como las N-cadherinas, cateninas y anillos de actina) que las mantienen unidas a otras células del tumor, adquiriendo la capacidad de adaptarse a nuevos nichos distantes.

El estudio detallado de estas características permite la identificación de alteraciones en vías de señalización y moléculas que participan en ellas como bio-marcadores del fenotipo canceroso, útiles para diseñar nuevas terapias específicas, siendo estos bio-marcadores los posibles blancos terapéuticos.

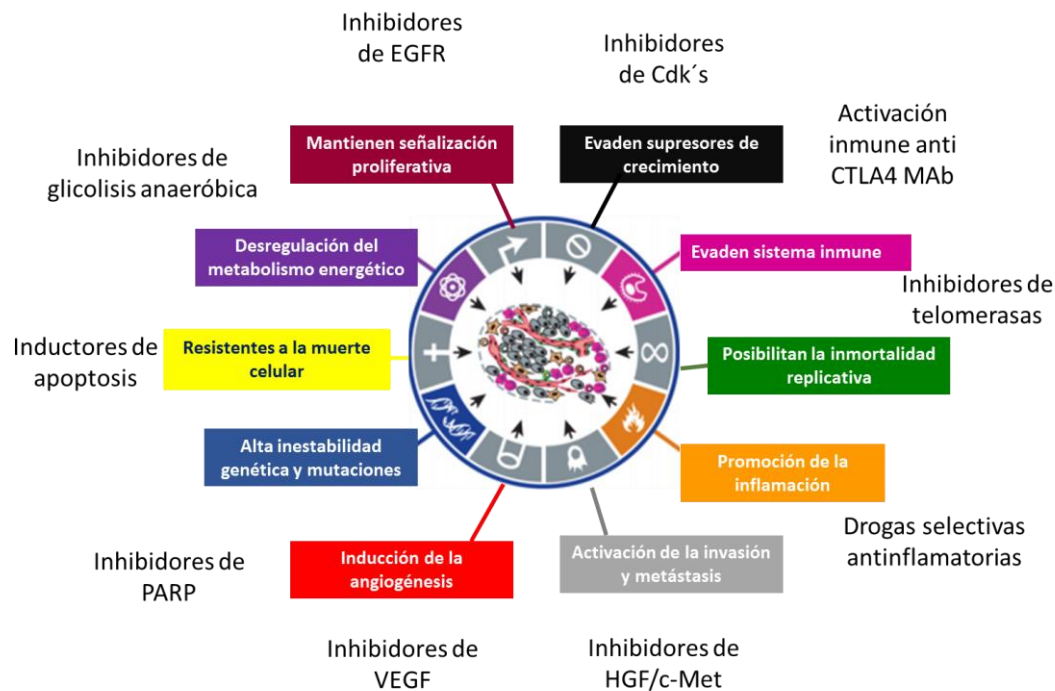


Figura 3. Las características distintivas del cáncer como posibles blancos terapéuticos. **Hanagan y Weinberg, 2011.**

1.1.5. Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales (MT) son sustancias producidas por las células cancerígenas, o bien por otras células del cuerpo en respuesta a la presencia de un cáncer, cuya presencia puede ser detectada en el suero u otros líquidos biológicos y que refleja el crecimiento o actividad tumoral y permite conocer la presencia, evolución o respuesta de un tumor maligno a un tratamiento. La mayoría de los MT son producidos tanto por células normales como por células tumorales, aunque se producen en niveles mucho más altos cuando hay un cáncer. Estas sustancias pueden encontrarse en sangre, orina y líquido ascítico o pleural entre otros, en los pacientes con cáncer (Hermida-Lazcano et al., 2016). Este tipo de sustancias sirven como herramienta de primera mano para el diagnóstico del cáncer (Romero et al., 2002).

Las dos características más importantes para ser considerados marcadores tumorales son la especificidad y la sensibilidad. De manera ideal un marcador tumoral debería ser específico de un solo tipo de cáncer y tener alta sensibilidad de forma que pudiera ser detectado en etapas tempranas del tumor, sin embargo, la mayoría de los marcadores tumorales se elevan en distintos tipos de neoplasias o incluso en patologías distintas al cáncer y son detectados cuando ya hay un importante avance de la enfermedad. A pesar

de ello los marcadores tumorales siguen siendo utilizados como herramientas de monitoreo en pacientes tratados o en regresión después del tratamiento.

Son pocos los marcadores bien caracterizados para ciertos tipos de cáncer, por mencionar algunos de los más usados son: antígeno carcino-embriionario (CEA) en cáncer de colon, alfa fetoproteína (AFP) en carcinoma hepatocelular, antígeno prostático específico (PSA) en cáncer de próstata, gonadotropina coriónica humana (b-HCG) en tumores de células germinales, CA 125 en tumores ováricos epiteliales, CA 15.3 en cáncer de mama metastásico, lactato deshidrogenasa (LDH) en melanoma y otras neoplasias (Perkins et al., 2003).

1.1.6. Lactato deshidrogenasa como marcador tumoral en melanoma.

Es bien sabido que las células tumorales tienen un metabolismo preferentemente anaeróbico, es decir, obtienen ATP a partir de la conversión de glucosa a lactato exhibiendo una baja fosforilación oxidativa aún en condiciones de normoxia. Este fenómeno es conocido como “efecto Warburg” y se sabe que puede conferir ciertas ventajas a la célula cancerosa para sobrevivir y continuar proliferando; por ejemplo, la glicolisis acelerada asegura los niveles de ATP necesarios para el requerimiento energético de las células proliferantes en un ambiente hipóxico, además de la alta glutaminólisis que aporta moléculas esenciales para biosíntesis de macromoléculas y necesaria para la división celular y crecimiento. También, en una manera importante el incremento en el consumo de glucosa podría jugar un papel protector contra la apoptosis por reproducción de células tumorales independiente de factores de crecimiento.

Para mantener la alta producción de lactato es necesaria la sobreexpresión de enzimas glicolíticas como la LDH, que es una enzima dependiente de NADH que cataliza la conversión piruvato a lactato, así como los transportadores de glucosa Glut-1 y Glut-3. Tanto HIF1 α como C-Myc son reguladores a nivel transcripcional de la LDH permitiendo la sobreexpresión de esta enzima (Fantin, 2006). Teniendo en cuenta que los valores normales de LDH plasmática en humanos es de 190-390 U/L, los niveles elevados de esta enzima pueden indicar cardiopatías, hepatopatías, enfermedades hematológicas, etc. Sin embargo, la LDH también puede verse dramáticamente elevada en diversos tipos de cáncer, como el glioblastoma, cáncer de pulmón, de mama y el melanoma, entre otros. Por lo que se utiliza la determinación de los niveles de LDH como herramienta para la detección, progreso de la enfermedad e incluso indicativo de metástasis, así como monitoreo para evaluar la respuesta del paciente a un determinado tratamiento anticancerígeno (Koukourakis et al., 2003; Sundstrøm et al., 2015).

1.1.7. Tratamientos convencionales contra el cáncer

En el cáncer intervienen factores propios tanto de las células malignas como del microambiente tumoral. El desarrollo exitoso de esta patología no depende solamente de las alteraciones moleculares que operan en las células malignas. Además, se hace

necesaria la participación del organismo que lo alberga. Involucra cambios genéticos, fisiológicos, inmunológicos y anatómicos complejos, que son difíciles de atacar en conjunto. Actualmente está tratando de cambiarse la visión que se tiene de esta enfermedad a modo de considerar al cáncer como una dolencia crónica, con la cual el paciente debe convivir. En este sentido, el enfoque terapéutico se orienta a focalizar los tratamientos no sólo en el tumor sino también en aspectos relativos a la invasión de los tejidos sanos, a la respuesta inmunológica del paciente y a los componentes genéticos propios de cada paciente.

La cirugía

La cirugía como estrategia para combatir el cáncer consiste en la extirpación quirúrgica completa de un tumor sólido y bien delimitado, en donde también se extrae una parte del tejido sano que rodea el tumor para garantizar que no queden remanentes de tumor que puedan seguir desarrollándose. Esta alternativa puede tener éxito siempre y cuando se trate de tumores primarios en estadio temprano y donde no haya evidencia de metástasis.

Radioterapia

Se basa en la utilización de radiaciones de alta energía como los rayos X, rayos gamma, haces de electrones o protones que pueden causar daño a las células cancerosa o incluso eliminarlas por completo. La radiación ocasiona pequeñas roturas en el ADN de las células cancerosas que evitan su división y el consecuente crecimiento del tumor. Generalmente es un tratamiento de aplicación local, sin embargo, puede administrarse de diferentes maneras, por ejemplo; radiación externa donde se usa una máquina que dirige los rayos desde fuera del cuerpo hacia el tumor; en la radiación interna o braquiterapia se coloca una fuente de radiación dentro o cerca del tumor en el cuerpo y; la radiación sistémica que administra medicamentos radiactivos vía oral o intravenosa. A pesar de tener muchos efectos secundarios, la radioterapia, es a menudo empleada y en algunos casos basta con esta técnica para acabar con el tumor, sin embargo, en muchos de los casos se utiliza en combinación con la cirugía o la quimioterapia.

Quimioterapia

Suele ser la primera opción de tratamiento, consiste en el uso de medicamentos de forma sistémica que destruyen las células cancerosas, teniendo la ventaja de poder atacar esta enfermedad aun estando diseminada. La finalidad de esta suele ser la curación, el control, o bien, ser usada como tratamiento paliativo para aliviar algunos de los síntomas que acompañan al cáncer. Algunos ejemplos de quimioterapeúticos comúnmente empleados para tratar el melanoma son Ipilimumab, Trametinib, Vemurafenib, Nivolumab, entre otros (American Cancer Society, ACS, 2017).

Inmunoterapia

Consiste en la activación del sistema inmune a través de diferentes estrategias para impedir que crezcan las células cancerosas o para eliminarlas haciendo más eficaces a las células del sistema inmunitario. Pueden consistir en anticuerpos monoclonales, para bloquear proteínas anormales en las células cancerosas y vías que evitan la respuesta inmune antitumoral o bien, para marcar a las células malignas para ser neutralizadas por células inmunes, un ejemplo son los antiPD-1/PD-L1 y CTLA-4 (Hodi et al., 2010), inmunoterapias no específicas que consisten principalmente en interferones e interleucinas; terapias con virus oncolíticos como el T-VEC (una versión genéticamente modificada del virus del herpes simple) que ingresan solo a las células cancerosas haciendo que estallen y mueran liberando antígenos que activan al sistema inmunitario para eliminar otras células cancerosas con esos mismos antígenos; en la terapia con células T, se modifican linfocitos T del paciente a manera que reconozcan ciertos receptores en las células tumorales y así destruir a las células cancerosas, se denominan receptores antigénicos quiméricos (chimeric antigen receptor, CAR); las vacunas contra el cáncer que pueden ser preventivas como la vacuna contra el VPH (virus del papiloma) y las terapéuticas que mejoran la detección de antígenos en las células cancerosas (American Society of Clinical Oncology, ASCO, 2017).

1.1.8. Ciclodipéptidos como moléculas con potencial anticancerígeno

Los tratamientos conocidos en la actualidad, pueden ser efectivos solos o en combinación, dependiendo de cada caso particular, ya que la estrategia suele ser, una vez identificado el tipo de cáncer, diseñar una terapia personalizada para cada paciente. Suelen obtenerse buenos resultados de estas estrategias terapéuticas en muchos tipos de cáncer, sin embargo, la amplia gama de neoplasias conocidas y emergentes hace difícil curarlos todos de forma exitosa, por lo cual la búsqueda de nuevas terapias es de vital interés en investigación. Muchos grupos de investigación alrededor del mundo se dedican a probar diversas sustancias, producidas por una amplia gama de organismos (plantas, hongos, bacterias, etc.) intentando encontrar nuevas alternativas de tratamiento que sean más específicas, selectivas y, por ende, que representen menores efectos secundarios a los pacientes oncológicos.

Un ejemplo de estas moléculas son los ciclodipéptidos (Figura 4), una clase de moléculas pequeñas, derivadas de la condensación de dos aminoácidos, biosintetizadas por un amplio rango de microorganismos. Se sabe que el 90% de las bacterias Gram negativas los sintetizan, pero también han sido aislados de bacterias Gram positivas, hongos, plantas y organismos marinos, así mismo pueden ser fácilmente sintetizados, debido a su simplicidad estructural (Prasad, et al., 1995; Fischer et al., 2003; Carvalho et al., 2012). Los ciclodipéptidos son sintetizados por una familia de enzimas formadoras de enlaces

peptídicos dependientes de tRNA llamadas ciclodipéptido sintasas (CDPS) y también por las Péptido Sintasas no Ribosomales (NRPS) (Belin et al., 2012; Gondry et al., 2009). Son abundantes en la naturaleza y desde el punto de vista biológico, son capaces de unirse a un amplio rango de receptores (Adriano et al., 2014).

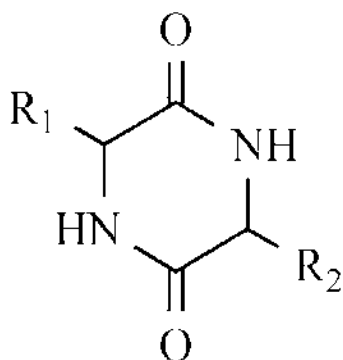


Figura 4. Estructura general de los ciclodipéptidos ó 2,5-diketopiperazinas. **Ciclodipéptidos presentan dos aceptores y dos sitios donadores de puentes de hidrógeno importantes para la unión a receptores (Hernandez –Padilla, 2017).**

Los ciclodipéptidos tienen la habilidad para simular grupos peptídicos que funcionan como farmacóforos, además de que son capaces de interactuar con blancos moleculares de las células debido a sus grupos aceptores y donadores de los enlaces hidrógeno, por lo que se les han encontrado diversas actividades biológicas como: antivirales, antifúngicas, antibacterianas, así como inductores de apoptosis. Algunas de las actividades biológicas importantes de las diketopiperazinas es la inhibición del inhibidor PAI-1 el cual es un activador plasminogénico perteneciente a la familia de los inhibidores serin-proteasas, que contribuye a la progresión de tumores (Brooks et al., 2003). Además de que los CDPs ciclo(L-Phe-L-Pro), ciclo(L-His-L-Pro) y ciclo(L-Pro-L-Tyr) muestran similitudes estructurales con péptidos de señalización endógenos como la hormona liberadora de tirotrópina. Más recientemente se ha reportado que *P. aeruginosa* produce ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), los cuales presentan propiedades en la estimulación del crecimiento vegetal de *A. thaliana* (Ortiz-Castro et al., 2011).

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

Por otra parte, en especies de *Psychrobacter* se aislaron un total de 16 diketopiperazinas de las cuales solo el ciclo(L-Phe-L-Pro) indujo citotoxicidad en células epiteliales intestinales de humano (Li et al., 2008). Además de las actividades ya mencionadas algunos CDPs inducen apoptosis en diferentes líneas celulares, como es el caso de ciclo(L-

Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Phe) aislado de especies de *Bacillus* (Hong et al., 2008), dichos CDPs inducen la disminución en la fosforilación de la quinasa de serin-treonina (AKT1).

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

Tabla 1. Actividades biológicas de los ciclodipeptidos. Los CDPs pueden ser producidos por diversos organismos y sus características estructurales y químicas les permiten poseer actividades biológicas que van desde anti fúngicos, antivirales, promotores de crecimiento e incluso potencial efecto anticancerígeno. Modificado de Hernandez- Padilla, 2017.

CICLODIPÉPTIDO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	ESPECIE	REFERENCIA
Ciclo(L-Phe-L-Pro)	Efecto antifúngico	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kanoh <i>et al</i> , 2000.
Ciclo(L-Val-L-Tyr) y Ciclo(L-Val-L-Phe)	Regulación de factores de virulencia bacterianos en modelo murino	<i>Staphylococcus aureus</i>	Wyatt M <i>et al</i> , 2010.
Ciclo(L-Pro-L-Tyr), Ciclo(L-Pro-L-Val) y Ciclo(L-Pro-L-Phe)	Muestran una actividad auxínica en <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ortiz-Castro <i>et al</i> , 2011.
Ciclo(L-Leu-L-Pro), Ciclo (L-Phe-L-Pro)	Actividad antiviral contra el virus de la influenza A (H3N2)	<i>Lactobacillus spp.</i>	Kwak M <i>et al</i> , 2013.
Ciclo(L-Pro-L-Tyr),Ciclo (L-Pro-L-Val) y Ciclo (L-Pro-L-Phe)	Efecto citotóxico en líneas celulares HeLa y CaCo-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vázquez-Rivera <i>el al</i> , 2015.

2. ANTECEDENTES

Los ciclodipeptidos, debido a sus características químicas y variedad de actividades biológicas, han cobrado interés en investigación y más aún sus posibles aplicaciones biotecnológicas. En nuestro grupo de trabajo se inició con el estudio de los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 y se encontró en 2011, que estos compuestos poseían actividad promotora de crecimiento en plantas usando como modelo *A. thaliana*, dicho efecto se le atribuyo a su parecido con auxinas, más específicamente con el ácido indolacético (IAA) y

se propuso la posible interacción de los CDPs con los receptores de auxinas (Ortíz-Castro et al., 2011). Así también se investigó la relación de los CDPs con el sistema de Quorum sensing de *P. aeruginosa* y como son sintetizados a través de péptido sintetasas no ribosomales (Omar González et al., 2016). En 2015, Vázquez-Rivera y colaboradores, reportaron que la mezcla de los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1 promueven apoptosis en las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2 de manera dosis dependiente, con una concentración inhibitoria 50% (IC50) de 0.53 y 0.66 mg/mL respectivamente. Posteriormente se investigó dentro del mismo grupo de trabajo, el mecanismo por el cual los CDPs de *P. aeruginosa* PAO1 inducen apoptosis en células HeLa usando inhibidores de caspasas, enzimas clave que participan en este tipo de muerte celular; la caspasa-8, característica de la vía extrínseca; caspasa-9 de la vía intrínseca y la caspasa-3 que es una caspasa efectora en donde convergen ambas. Los resultados indicaron que los ciclodipeptidos inducen muerte celular por apoptosis a través de la vía intrínseca, por la inhibición de la fosforilación de la proteína Akt, involucrada en la inhibición de la apoptosis (Hernandez-Padilla et al., 2017).

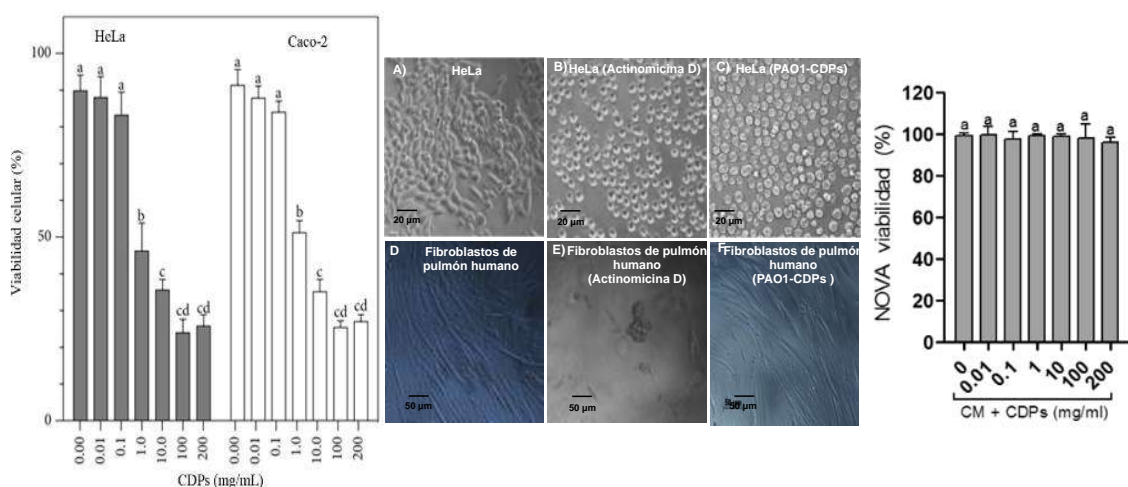


Figura 5. Efecto citotóxico de los CDPs en células cancerosas. En la gráfica de la izquierda se muestra la viabilidad celular en forma dependiente de la dosis de los PAO1-CDPs sobre las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2. En las fotografías A, B y C; células HeLa sin tratamiento, tratamiento con Actinomycin D y tratamiento con PAO1-CDPs, respectivamente; D, E y F son células no cancerosas con los mismos tratamientos que las células HeLa. La gráfica de la derecha muestra el efecto de los CDPs en la viabilidad de los fibroblastos de pulmón (Modificado de Vázquez-Rivera et al., 2014).

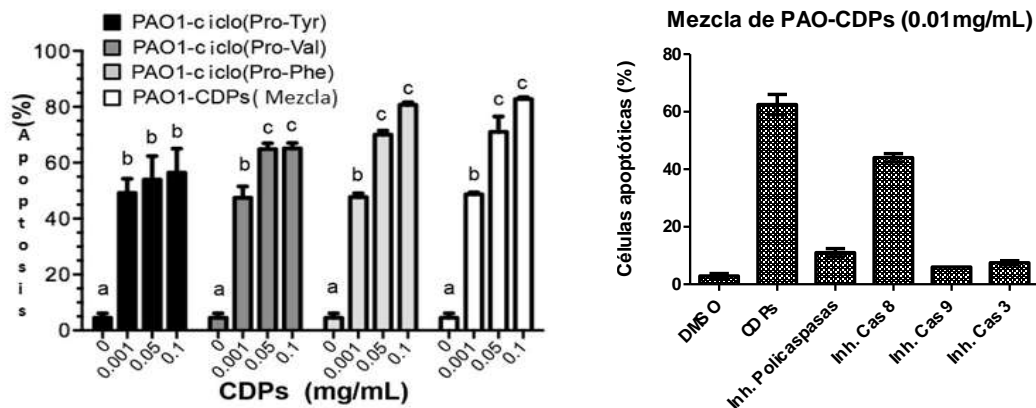


Figura 6. Inducción de apoptosis en células HeLa por los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1. A la izquierda; inducción de apoptosis en células HeLa comparando el efecto de los PAO1-CDPs individuales y en mezcla. A la derecha; ensayo de inducción de apoptosis usando inhibidores de caspasas participantes en las diferentes vías apoptóticas (Modificado de Hernández-Padilla et al., 2017).

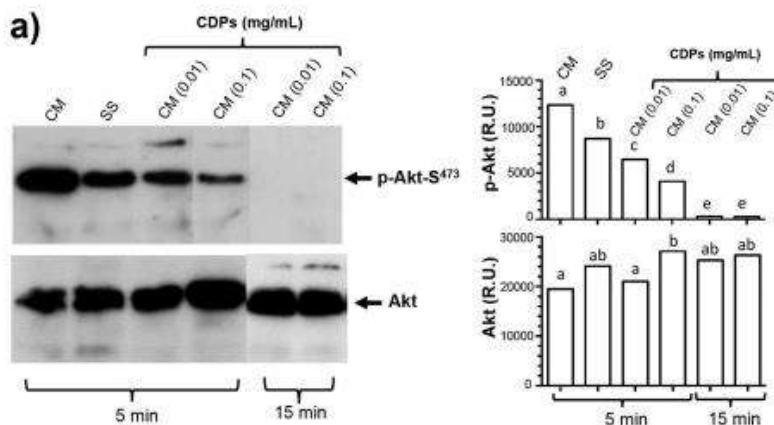


Figura 7. Efecto de los ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* PAO1 en la expresión y fosforilación de Akt en células HeLa. A la izquierda; ensayo de inmunodetección por Western blot de la forma fosforilada y desfosforilada de la cinasa Akt a diferentes concentraciones de CDPs y tiempos de tratamiento. A la derecha se muestra la cuantificación por densitometría de las bandas (Modificado de Hernández-Padilla et al., 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la mezcla de ciclodipéptidos, 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 dependiente de la proteína-kinasa Akt. Sin embargo, se desconoce si estos metabolitos presentan efecto antiproliferativo en

tumores inducidos en un modelo *in vivo*, por lo que es de nuestro interés evaluar si dichos compuestos inhiben la proliferación de tumores en un modelo murino.

4. HIPÓTESIS

Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 poseen efecto antitumoral en un modelo *in vivo* de melanoma murino.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antitumoral de los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en modelo *in vivo* de melanoma murino.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en la línea celular B16/F0 de melanoma de murino.
2. Determinar el efecto antitumoral de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 sobre tumores inducidos en el modelo murino.
3. Determinar el mecanismo molecular involucrado en el efecto antitumoral de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 en el modelo de melanoma murino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Células B16/F0

Se usó la línea celular B16F/0 (de tumor primario de melanoma murino) fue obtenida en 1987 a partir de un melanoma espontaneo en la oreja de un ratón de la cepa C57BL/6. Al ser singénica esta línea a la cepa de ratones C57BL/6 permite la obtención de un modelo de melanoma en ratones inmunocompetentes con muy baja probabilidad de rechazo inmunológico.

Las células B16/F0 donadas por la D.C. Ruth Noriega Cisneros, fueron sembradas en placas de 10 ml para cultivo celular en medio mínimo esencial Dulbecco's (DMEM) F12k Ham con

NaHCO₃ (1.5 g/l), penicilina/estreptomicina al 1% (10,000U/l de penicilina y 10 mg de estreptomicina) y 10% v/v de suero fetal bovino, pH 7.4, mantenidas a 37°C y 5% de CO₂.

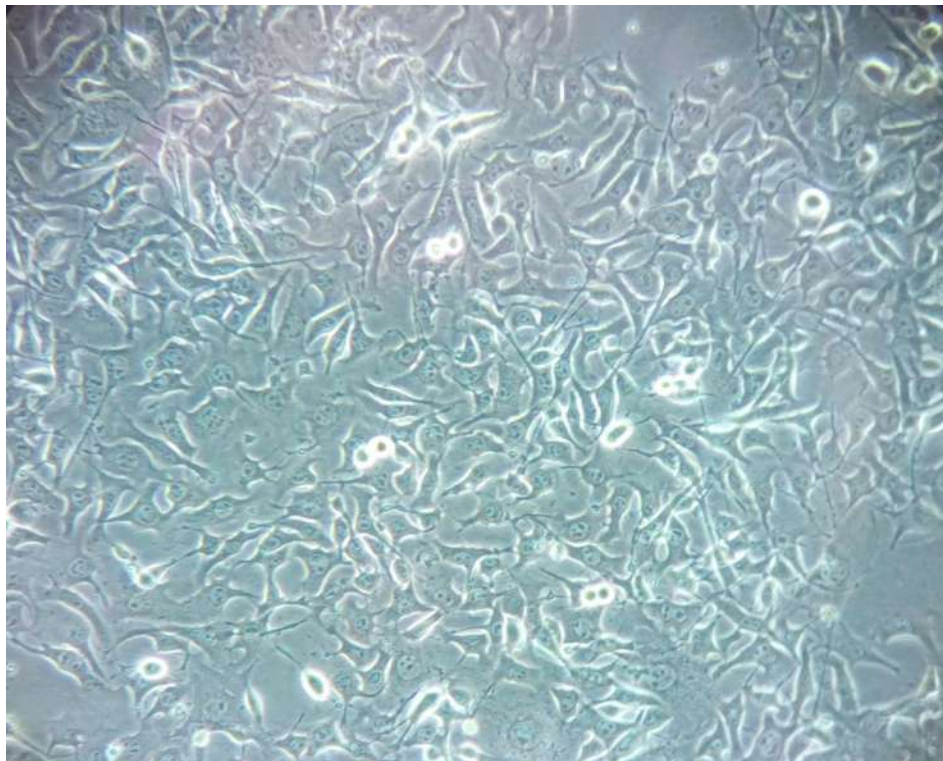


Figura 8. Microfotografía de células de melanoma murino B16/F0 en cultivo en medio DMEM (objetivo 40x).

6.1.1. Verificación de viabilidad de la suspensión de células B16F/0

La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano 0.4% (GIBCO) para esto se tomaron 20 µl de suspensión celular y se le agregó azul de tripano. El conteo celular se llevó a cabo con la cámara de Neubauer y únicamente la suspensión con 95% de viabilidad se usó para la inoculación de los ratones C57BL/6.

6.1.2. Ensayo de viabilidad celular en células B16/F0 por reducción de MTT

Se cultivaron 2×10^4 células B16/F0 por pozo en placas de 96 pozos (Corning) de fondo plano en un volumen de 200 µl de medio completo DMEM e incubando a 37 °C y 5% de CO₂. Para sincronizar las células después de 24 h (hasta 80% de confluencia) se cambió a medio incompleto (desprovisto de suero) y se incubaron por 4 h. Posteriormente a las células se les adicionaron diferentes tratamientos con la mezcla de los CDPs (0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL). Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) a la misma concentración usada para disolver la mezcla de CDPs. Se incubaron con los

tratamientos 12 h a 37°C y 5% de CO₂. Se adicionaron 10 µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5 mg/ml) (Sigma), a cada pozo y se dejó actuar durante 4 h. Luego se resuspendieron los cristales de formazan con 100 µL de isopropanol-HCL M (19:1 v/v) y después de 30 minutos se leyeron las muestras en un espectrofotómetro para microplacas Biotek Epoch a 595nm, mezclando durante 60 s en cada lectura. Los datos fueron recolectados y extraídos con el software Microplate manager (Biotek). Se realizaron 2 ensayos para cada tratamiento con cuatro repeticiones cada uno.

6.1.3. Ensayo de muerte celular por citometría de flujo

Para el ensayo se utilizaron marcadores de muerte celular por apoptosis y necrosis (Anexina V/Yoduro de propidio, respectivamente). Las células B16F/0 fueron cultivadas y tratadas en cajas de 96 pozos, se sembraron 2×10^4 células en 200 µl de medio completo a 37°C y 5% de CO₂, una vez que estuvieron a 80% de confluencia (24 h de incubación) se le cambió a medio incompleto para sincronizar las células, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y se aplicaron los tratamientos como se describió anteriormente. El tiempo de tratamiento para este ensayo fue de 4 h. Al finalizar el tiempo de incubación con los tratamientos, las células se despegaron con tripsina para luego centrifugarlas a 2,500 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 100 µl de PBS, repitiendo este proceso 2 veces. Luego se centrifugó por 10 min a 2,500 rpm a 4°C, se lavó la pastilla con 100 µl de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄*2H₂O 0.1 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM) filtrado y estéril a pH 7.4. Se centrifugó y la pastilla se resuspendió con 20 µL de buffer de unión a Anexina (10 mM de HEPES, 140 mM NaCl₂, pH 7.4). Se adicionó 1 µL del conjugado Anexina V (Life technologies) y 1 µL de yoduro de propidio (1:4) (1 mg/mL) (Sigma). Se dejaron incubar las células a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se aforo a 100 µL con el buffer de Anexina V y se mezcló cuidadosamente (las muestras se mantuvieron en hielo). Se analizaron las muestras por citometría de flujo en un citómetro BD Accuri. Para detectar apoptosis se analizó la emisión de fluorescencia en el canal FL1 a 535/617 nm, así como para detectar necrosis se analizó la emisión de fluorescencia en el canal FL2 a 535/617 nm. Se analizó un mínimo de 20,000 eventos celulares.

6.2. Obtención de los ciclodipeptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) 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) a un pH de 7.0.

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

Una vez obtenida la fase orgánica, se procedió a evaporar hasta sequedad (Rotavapor R-215; Buchi) a 60 °C. A la cantidad recuperada se solubilizó con 1 ml de acetato de etilo acidificado. La muestra fue concentrada hasta sequedad en vacío en un concentrador; LABCONCO. Para verificar la presencia y pureza de los CDPs se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

6.3. Cepa de ratones C57BL/6

Un total de 30 ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad y peso entre 17-20 g (ENVIGO Research Models and Services) fueron mantenidos en condiciones óptimas de temperatura, ventilación y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Dieta *ad libitum* y agua purificada. Se mantuvieron en contenedores plástico con reja de acero inoxidable con medidas de 27 x 21.5 x 12 cm separados los diferentes grupos experimentales y etiquetados adecuadamente. Todos los procedimientos de cuidado y manejo de los ratones fueron realizados bajo los estándares de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.3.1. Grupos de ratones

Los ratones se dividieron al azar en 5 grupos de 6 individuos cada uno obteniendo los siguientes tratamientos:

- Grupo 1: como control consistió en ratones sin melanoma (no fueron inoculados con las células cancerosas) y administrados con solución salina inyectable estéril/DMSO 0.1%
- Grupo 2: ratones sin melanoma administrados con los ciclodipeptidos de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1-CDPs)
- Grupo 3: ratones inducidos con melanoma y administrados solo con solución salina inyectable estéril/DMSO 0.1%
- Grupo 4: ratones inducidos con melanoma y tratados con los PAO1-CDPs desde que se inocularon las células cancerosas
- Grupo 5: ratones inducidos con melanoma y tratados con los PAO1-CDPs a partir de que el melanoma fue detectable por palpación y visible (al 8° día post inoculación).

6.3.2. Preparación de la suspensión celular para la inoculación de ratones

Las células en cultivo con un 80% de confluencia se desprendieron con tripsina al 0.05% con EDTA, se lavaron 2 veces con PBS con centrifugaciones a 1,500 rpm/25°C/10 min y el paquete celular se re suspendió nuevamente en medio DMEM, la suspensión celular se ajustó con medio completo DMEM de tal manera que se obtuviera una concentración final de 5×10^5 células/100 μ l.

6.3.3. Inducción de los tumores con células B16/F0

Un total de 18 ratones C5BL/6 fueron inyectados (con jeringas para insulina BD Ultra Fine™ de 0.5 ml) vía subcutánea en el costado inferior derecho, cada uno con 5×10^5 células B16/F0 suspendidas en un volumen de 100 μ l de medio completo DEMEM verificando previamente la viabilidad celular del 95%. A todos se les retiró el pelo de la zona de inoculación. La adecuada inoculación de las células se verifico por la formación de un ápula en el sitio de inyección. Se monitoreó el peso de los ratones diariamente, así como la aparición de masa tumoral alrededor del día 10 post inoculación en el 100% de los ratones.



Figura 9. Fotografía de ratones a los 10 días de ser implantados con células de melanoma B16/F0 en el costado inferior derecho, la protuberancia señalada en verde es un melanoma.

6.4. Tratamiento con la mezcla de ciclodipéptidos de *P. aeruginosa* PAO1

El tratamiento consistió en administrar la mezcla de ciclodipéptidos (PAO1-CDPs) disueltos en solución salina inyectable estéril con DMSO al 0.1% como vehículo, por vía intravenosa a través de la vena caudal (vena de la cola). La dosis fue de 100 mg/kg de peso cada 7 días. Los grupos 1 y 2 se administraron con la solución inyectable/DMSO a cada que se administró a los grupos tratados con los PAO1-CDPs.

6.5. Monitoreo de volumen tumoral

El crecimiento del tumor se monitoreó diariamente por 20 días en todos los ratones. Se tomaron en cuenta dos tipos de diámetros y cada tumor fue medido con una regla. El volumen se calculó usando la fórmula $(0.4 ab^2)$ siendo 'a' el diámetro largo y 'b' el diámetro corto (García-Hernández, 2002).

6.6. Sacrificio de los ratones y extracción de muestras biológicas.

El sacrificio de los animales se realizó por sobredosis anestésica con Pentobarbital sódico a una dosis de 100-150 mg/kg vía intraperitoneal (como norma general el triple de la dosis anestésica). Se corrobora la anestesia profunda por falta de reflejos nociceptivos al pinchar o pellizcar la cola o las patas del ratón.

6.7. Muestras de sangre

Una vez anestesiado el ratón lavar la cola de cualquier resto de heces u orina y aplicar etanol al 70% dejándolo evaporar. Se realizó el corte con tijeras quirúrgicas aproximadamente 1-2 mm desde el extremo de la cola. Se realizó la limpieza y desinfección de las tijeras entre animales. Se tomó muestra en tubos capilares heparinizados para la determinación de hematocrito, muestra en portaobjetos para frotis

sanguíneo y sangre sin anticoagulantes para obtención de suero sanguíneo (alrededor de 500 ml por punción cardiaca).

Para a obtención del suero se centrifugo la sangre sin anticoagulante a 3500 rpm/10 min a temperatura ambiente. Se separó el suero teniendo cuidado de no tomar el coagulo de fibrina o la fracción de plaquetas y leucocitos, se pasó el suero en tubos rotulados con los datos necesarios: ratón, grupo, tipo de muestra y fecha, para posteriormente ser almacenados a -80°C hasta su utilización.

6.7.1. Determinación de hematocrito

Se tomó sangre en el tubo para micro-hematocrito por capilaridad directamente de la cola hasta aproximadamente un 70% de su capacidad, se selló con fuego y se centrifugo a 10,000 rpm por 5 minutos. Para la determinación se coloca sobre una regla el tubo capilar de manera que el fondo de la columna de eritrocitos toque la línea que marca el 0, determinando los milímetros de sangre totales (correspondiente a la fracción roja a y a la fracción de plasma) y los milímetros que ocupa solo la fracción roja, el cálculo realizado es el siguiente:

$$(\text{mm Totales} \div \text{mm de eritrocitos}) \times 100 = \% \text{ hematocrito}$$

6.7.2. Determinación de hemoglobina

Se realizó por medio de la determinación de la relación Hemoglobina-hematocrito, considerando como factor de relación 3.3 (debido a que la hemoglobina representa el 32% de la masa total del glóbulo rojo), por lo que el cálculo realizado fue a partir de los valores obtenidos de hematocrito de la siguiente manera:

$$(\text{Hto}) \times 3.3 = \text{Hb}$$

6.7.3. Conteo diferencial de leucocitos

Los frotis realizados al momento del sacrificio fueron adecuadamente rotulados y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se tiñeron con colorante de Wright (Hycel 840) colocándolos verticalmente sobre una rejilla bien nivelada, se adiciono aproximadamente 0.5mL de colorante sobre cada laminilla verificando que no se derrame el colorante y quede totalmente cubierto, esperamos 7 min y se agregó una cantidad igual de Buffer de fosfatos pH 6.4 (Hycel 1317) y se dejó otros 3 min hasta ver un aspecto metálico en la solución para finalmente descartar esta última y enjuagar las laminillas con agua corriente para retirar los excesos de Wright, se dejaron secar las laminillas para su lectura al microscopio.

Una vez teñidas y secas las laminillas se observaron al microscopio en objetivo 100x y con aceite de inmersión. Se observaron diferentes campos de la laminilla hasta completar un

conteo total de 100 células blancas diferenciando la cantidad de Linfocitos, Monocitos, Neutrófilos, Basófilos y Eosinófilos y representando el resultado en porcentaje.

6.7.4. Detección de las enzimas plasmáticas lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)

Las muestras de suero obtenidas como se indicó anteriormente fueron procesadas en un Analizador Automatizado de Química Seca Vitros 350. Se colocaron 50 µl de la muestra en el “slide” y alrededor de 5min después el equipo muestra los resultados obtenidos para cada una de las enzimas.

6.7.5. Tumores y órganos

Se fijó el animal a la superficie de sacrificio en posición ventral para la extirpación del tumor. Una vez extraído el tumor se colocó al ratón en posición dorsal y se extrajeron los órganos: Corazón, pulmones, riñones, hígado y bazo. Tanto los tumores como los diferentes órganos se lavaron con PBS para retirar restos de sangre. Se determinaron los siguientes pesos: ratón vivo, tumor, ratón sin tumor, y el peso de cada órgano. Una parte de estos se almaceno en para-formaldehido (PFA) 4% a 4°C hasta su uso y otra parte se guardó a la brevedad en congelación a -80°C.

6.7.6. Histología de tumores y órganos

Fijación

Las diferentes muestras fueron conservadas en para-formaldehido al 4% en PBS fresco a pH 7.4 en un volumen diez veces mayor al tamaño de la muestra para garantizar una buena penetración del PFA y fijación del tejido, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

Deshidratación e inclusión

Para el caso de las muestras que serían incluidas en parafina se sacaron del PFA los tejidos y se colocaron en cassetes plasticos de inclusión bien rotulados. Se realizó la deshidratación colocando los cassetes en frascos con alcohol a diferentes concentraciones de la siguiente forma:

EtOH 70% (x2) ----- 30 min c/u

EtOH 80% (x2) ----- 30 min c/u

EtOH 96% ----- 1.5 h
EtOH absoluto (x2) ----- 1 h c/u
EtOH/xileno 1:1 (x2) ----- 1h c/u
Xileno (x2) ----- 30 min c/u

Después del último pase en xileno se sumergieron en parafina epóxica líquida y se dejaron toda la noche para después colocar los tejidos en moldes metálicos y dejar solidificar los bloques a temperatura ambiente.

Para los tejidos que se incluirían en congelación se realizó una deshidratación por gradiente de sacarosa. Se retiraron los tejidos del PFA, se colocaron en sacarosa al 10% en PBS y se mantuvieron a 4°C hasta que los tejidos quedaran en el fondo del tubo, posteriormente se repitieron estos pasos con concentraciones de sacarosa al 20% y 30%. Los tejidos se usaron a la brevedad para evitar contaminación por hongos. Se colocaron los tejidos en moldes plásticos y se incluyeron en Tissue Tek® a -25°C hasta que este solidificara.

Cortes histológicos

Los bloques de parafina bien atemperados de dejaron enfriar 30 min antes de ser cortados en microtomo Leica RM2125 RTS a 5µm de grosor de corte, se suspendieron en agua a 40°C para su extensión y se colocaron en laminillas gelatinizadas. Las laminillas se secaron a temperatura ambiente y se dejaron en rejillas metálicas en estufa para retirar el exceso de parafina.

Los tejidos incluidos en Tissue-Tek O.C.T 579, fueron cortados en Criostato Leica CM1850 a -25°C con un grosor de 10 µm y fijados en laminillas gelatinizadas. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Tinción Hematoxilina- Eosina

Las laminillas se colocaron en frascos Coplin, con xileno para desparafinar y se hidrataron en diferentes concentraciones de alcoholes por 3min en cada alcohol hasta llegar a agua destilada. Se sumergieron en Hematoxilina de Harris (Hycel 738) 3 min, se quitó el exceso de colorante con agua corriente y se diferenciaron con HCl, se neutralizaron con agua de la llave y se pasaron a Eosina amarillenta 1% (Hycel 688) durante 2 min. Se deshidrató de nuevo el tejido en alcoholes y se montaron las laminillas con resina sintética en xilol al 60% (Hycel 7987).

Análisis histopatológico

Las laminillas ya teñidas se analizaron y fotografiaron en un microscopio Leica DM 3000 y el programa (falta nombre del programa que use) observando diferentes campos representativos y en objetivos 10x, 40x y 100x.

6.7.7. Detección de proteínas de fenotipo canceroso en melanoma por micro arreglo

Muestras representativas de los tumores con diferentes tratamientos congeladas a -80°C fueron homogenizadas por dos pulsos de sonicación a baja intensidad por 30 segundos a 4°C (Hielscher-LS24 Ultrasound Technol), con 300 μl de buffer de lisis PB compuesto por [Hepes 50 mM pH 7.6, pirofosfato de sodio 50 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, molibdato de sodio 1 mM, EGTA 20 mM, benzamidina 1 mM, NaF 20 mM, PMSF 0.2 mM, β -glicerofosfato 80 mM, manitol 200 mM, coctel inhibidor de proteasas 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich Co). Se obtuvieron los extractos de proteína por centrifugación de los homogenados totales a 7500 rpm a 4°C por 15 minutos. La proteína fue determinada por el método de Bradford (BioRad) y se agregó 30 μg de proteína a cada pozo de la placa del PathScan Cancer Phenotype Antibody Array Kit, Cell signaling Technology y se cubrió con la cinta protectora. Para la inmunodetección se bloqueó y posteriormente se incubó toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante con el coctel de detección 1 hora. Se adicióno Streptavidin conjugado con HRP, se tapó e incubó 30 min con agitación constante. Para revelar de uso LumiGlo®/Peroxide e inmediatamente se fotografió el microarreglo usando un sistema digital de detección de quimioluminiscencia. La determinación de intensidad de la señal en los puntos del micro arreglo se realizó por densitometría usando el Image J software.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de la mezcla de ciclodipeptidos en la viabilidad de la línea celular B16/F0

Previamente en nuestro grupo de trabajo se demostró que los PAO1-CDPs tienen efecto citotóxico *in vitro* en las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2 con una LD_{50} de 0.06 mg/ml para la línea Hela a las 24 horas de tratamiento e inducen apoptosis en dichas células a una EC_{50} entre 1.6×10^{-4} y 5×10^{-5} mg/mL (Hernandez-Padilla et al., 2017). Con la finalidad de saber si los ciclodipeptidos mostraban un efecto similar en la línea B16 de melanoma murino, realizamos primero ensayos de MTT para ver viabilidad celular a concentraciones crecientes 0.001- 1 mg/ml de los CDPs y posteriormente ensayos para ver apoptosis por citometría de flujo. Los resultados de la figura 10 muestran un efecto dosis dependiente tanto en la pérdida de viabilidad como induciendo muerte por apoptosis en las células de melanoma. A las 12 horas de tratamiento se observó una pérdida de viabilidad de aproximadamente el 75% de las células en cultivo con una LD_{50} de 0.0126 mg/mL, mientras que para la inducción de muerte celular se observó hasta un 60% de células apoptóticas a las 4 horas de tratamiento con los CDPs.

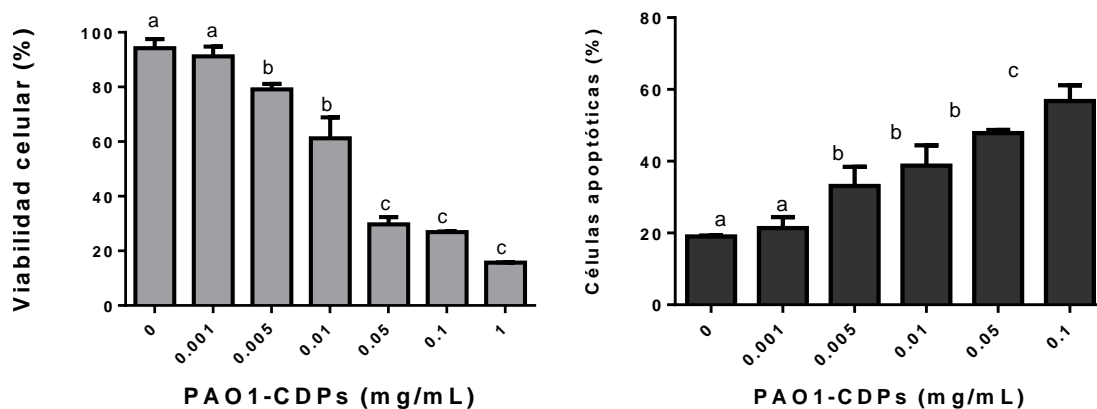


Figura 10. Efecto de los PAO1-CDPs en la viabilidad celular e inducción de apoptosis en células B16 de melanoma. A) Viabilidad celular por MTT en células B16 tratadas 12 h con ciclodipeptidos de *P. aeruginosa* PAO1. B) Ensayo de apoptosis a 4 h de tratamiento con ciclodipeptidos en células B16. Las barras representan la media \pm error estándar (SE) de tres experimentos independientes $n=4$. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) prueba de Tukey; la significancia estadística ($P < 0.05$) de las diferencias entre tratamientos se indica con letras diferentes.

7.2. Efecto de los ciclodipeptidos de *P. aeruginosa* PAO1 en el peso de ratones C57BL6 inducidos con melanoma.

Para evaluar el efecto anti-proliferativo de los PAO1-CDPs *in vivo* utilizamos un modelo de melanoma, induciendo tumores con inyección subcutánea de células B16/F0 en ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad. Una vez visibles los tumores se formaron grupos de 6 ratones que consistieron en un grupo sin tumor ni tratamiento con CDPs (en las figuras se indica como "Control"), un grupo sin tumor y con tratamiento con CDPs (indicado en las figuras como "CDPs"), un grupo con tumor y sin tratamiento (indicado como "Melanoma"), un grupo con tumor y tratamiento con los CDPs desde que fue inducido el tumor (indicado como "Melanoma + CDPs/día 0") y un grupo inducido con tumor y tratado con los CDPs a partir de que fue visible el tumor (indicado como "Melanoma+CDPs/día 8"). Se monitoreo el peso cada tercer día para evaluar el progreso del crecimiento tumoral, así como el estado general de salud de los diferentes grupos. Los tres grupos que fueron inducidos con melanoma mostraron una mayor ganancia de peso respecto al control a partir del 8° día, esto debido al crecimiento de la masa tumoral. Sin embargo, dicha ganancia de peso en los dos grupos tratados con los PAO1-CDPs fue menor que en el grupo que no recibió el tratamiento. Por otra parte, el grupo de ratones sin tumor y tratados con los CDPs registro una ganancia de peso igual que el grupo control, lo cual parece indicar que a la dosis de 100 mg/kg de peso los CDPs no afectan la

salud de los ratones en el sentido de limitar el crecimiento de los ratones afectando el apetito y/o aprovechamiento del alimento (figura 11A).

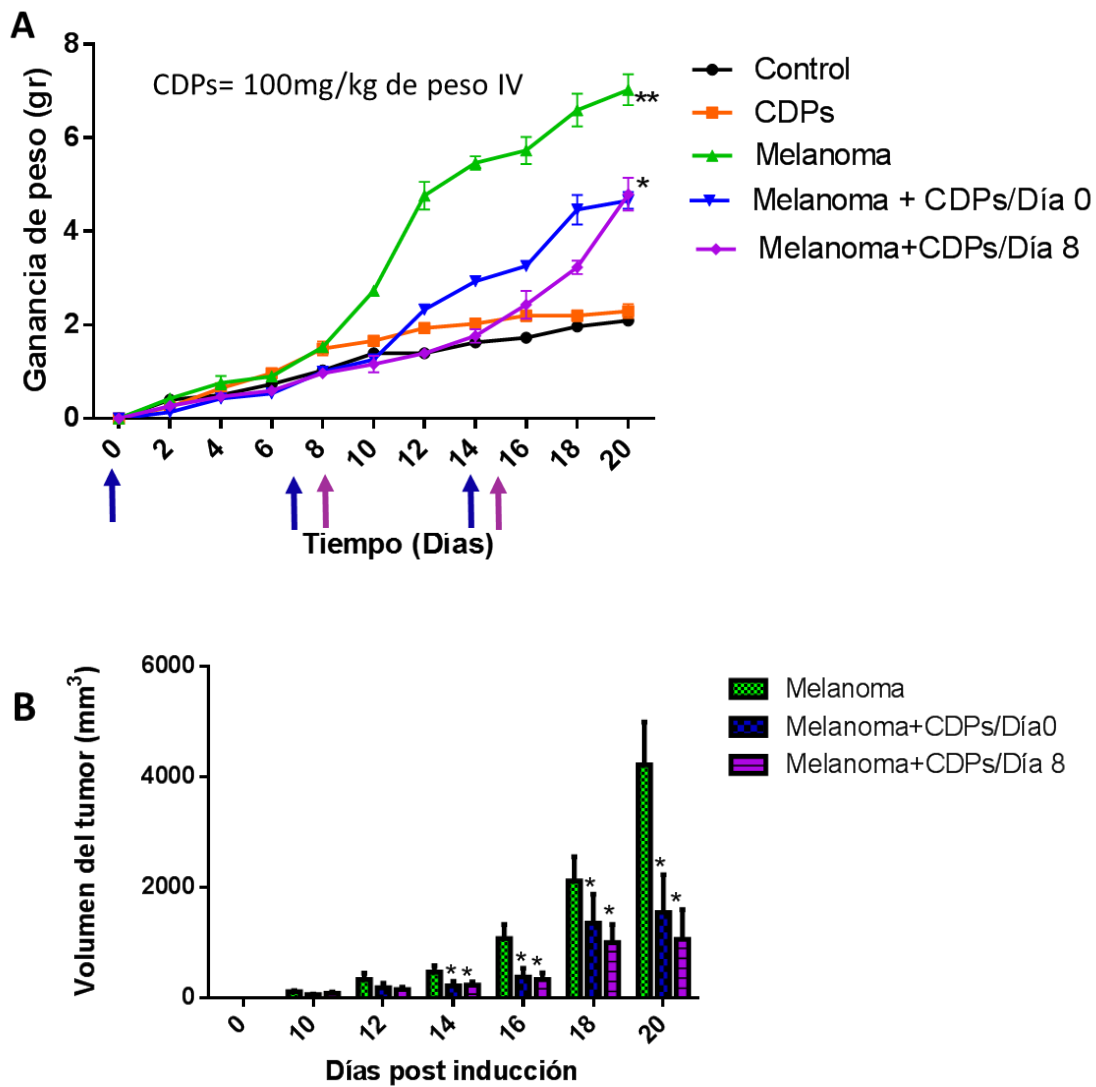


Figura 11. Registro de peso de los ratones C57BL/6 y volumen tumoral durante el tratamiento con CDPs.

A) Los diferentes grupos de ratones C57BL/6 fueron pesados desde la inducción de los tumores y a lo largo del tratamiento con CDPs y B) se midió el volumen de los tumores diariamente. Las barras representan media \pm error estándar de un experimento, $n = 6$. Se usó ANOVA de una vía con prueba de Bonferroni para comparar los tratamientos con el grupo no tratado. La significancia estadística ($P < 0.05$) de las diferencias entre tratamientos se indica con con asteriscos (*). Control = grupo sin inducción de melanoma y sin tratamiento con CDPs; CDPs= grupo sin melanoma y administrado con los ciclodipéptidos; Melanoma = grupo inducido con melanoma sin tratamiento; CDPs/Día 0 = grupo tratado con ciclodipéptidos desde que se implantaron las células de melanoma; CDPs/Día 8 = grupo tratados con ciclodipéptidos a partir de que el melanoma fue visible.

7.3. Evaluación del efecto de los CDPs en el volumen tumoral.

Una vez inducido el melanoma en los grupos de estudio se monitoreo diariamente, primero la aparición de tumores subcutáneos en los ratones inyectados con las células B16 (apreciables por palpación con un volumen aproximado de 50 mm³), y segundo el crecimiento de los tumores, midiendo con una regla los diámetros mayor y menor de la masa tumoral. Lo que observamos fue que desde el día 12 post inducción hubo una pequeña diferencia entre el tamaño de los tumores control (sin tratamiento) y los tumores con tratamiento, donde los segundos registraban un volumen menor. Dicha diferencia fue más notoria conforme avanzo el tratamiento. Los melanomas en ratones tratados con los CDPs mostraron una significativa disminución del volumen tanto en el grupo tratado desde el inicio con un volumen promedio de aproximadamente 1.5 cm³, así como en el grupo tratado a partir de que los tumores fueron visibles (10° día) con un volumen aproximado de 10.0 cm³ respecto al grupo no tratado que mostro un volumen de ~5 cm³ (figura 11B).

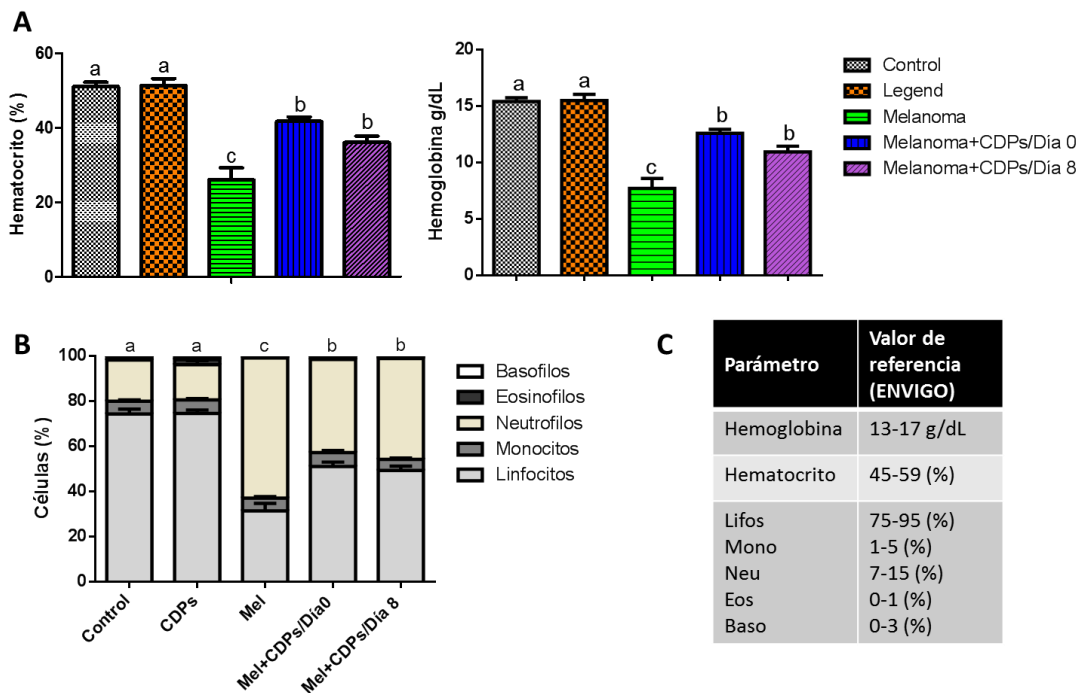


Figura 12. Parámetros hematológicos de ratones con melanoma. Una vez concluido el tratamiento con CDPs los diferentes grupos fueron sacrificados y se determinaron diferentes parámetros. A) valores de hemoglobina y hematocrito; B) conteo diferencial de células blancas en sangre periférica; C) valores de referencia de los diferentes parámetros sanguíneos en ratones C57BL/6. Las barras representan media \pm error estándar de un experimento, n= 6. Se uso ANOVA de una vía con prueba de Bonferroni para comparar los tratamientos con el grupo no tratado. La significancia estadística ($P < 0.05$) de las diferencias entre tratamientos se indica con letras deferentes. Control = grupo sin inducción de melanoma y sin tratamiento con CDPs; CDPs= grupo sin melanoma y administrado con los ciclodipeptidos; Melanoma = grupo inducido

con melanoma sin tratamiento; CDPs/Día 0 = grupo tratado con ciclodipéptidos desde que se implantaron las células de melanoma; CDPs/Día 8 = grupo tratado con ciclodipéptidos a partir de que el melanoma fue visible.

7.4. Evaluación de parámetros sanguíneos en ratones inducidos con melanoma y tratados con los ciclodipéptidos.

Con la finalidad de evaluar el estado general de salud de los ratones que conformaron los diferentes grupos se extrajo la sangre total para la determinación de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto) (figura 12), así como el conteo de células blancas (figura 12B) como se indica en la sección de materiales y métodos. Los resultados mostraron que, en la presencia del melanoma, los ratones presentan un cuadro de anemia severa reflejada por la significativa disminución de los valores de Hb y Hto con respecto al grupo control (ratones sin melanoma ni tratamiento). En cuanto al conteo leucocitario, los grupos con melanoma tuvieron un aumento significativo en el porcentaje de neutrófilos que podría representar un estado de inflamación crónica, originado por la presencia del tumor, valores que disminuyen asemejándose más a los valores normales en los ratones tratados con los CDPs. Además, se analizó la morfología de las células sanguíneas (figura 13) encontrando fenotipo de equinocitos en los glóbulos rojos (morfología comúnmente vista en pacientes oncológicos e indicativo de anemia) de ratones con melanoma sin tratamiento. Tanto los valores de Hb y Hto como el conteo de células blancas y la morfología de los eritrocitos se mantuvieron dentro de los valores normales en el grupo sin melanoma y que fue administrado con los CDPs, indicando que los CDPs aparte de retrasar el crecimiento de los tumores ayuda a mejorar la salud de los ratones con melanoma.

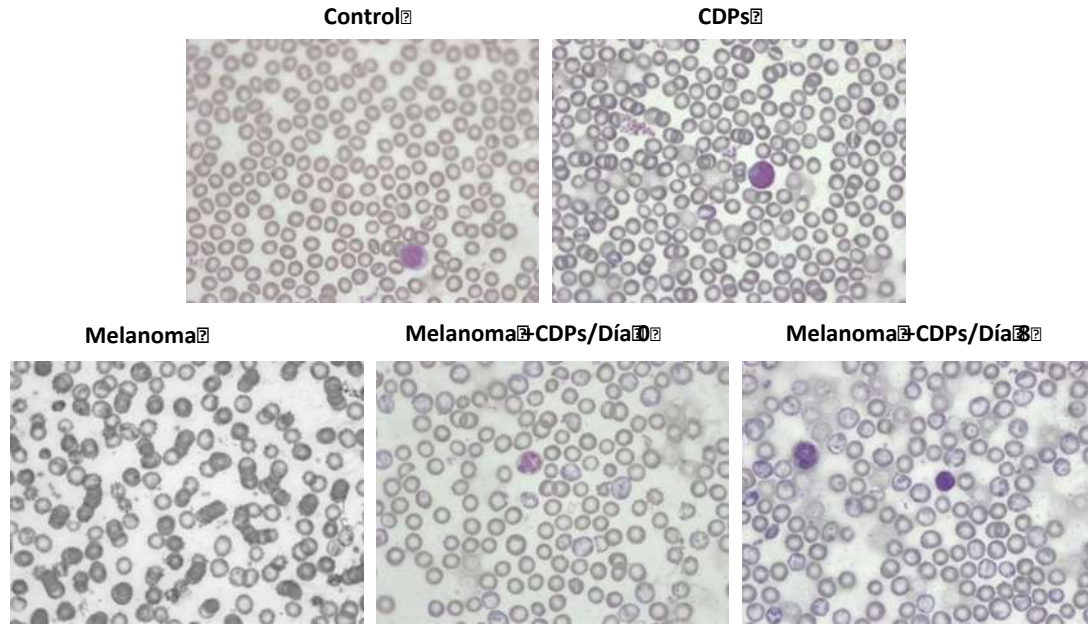


Figura 13. Morfología de células sanguíneas de ratones inducidos con melanoma. Las fotografías muestran las diferencias en la morfología de glóbulos rojos (indicados con un asterisco) y células blancas (de color morado), en los diferentes grupos. Tinción de Wright, visto en objetivo 100x.

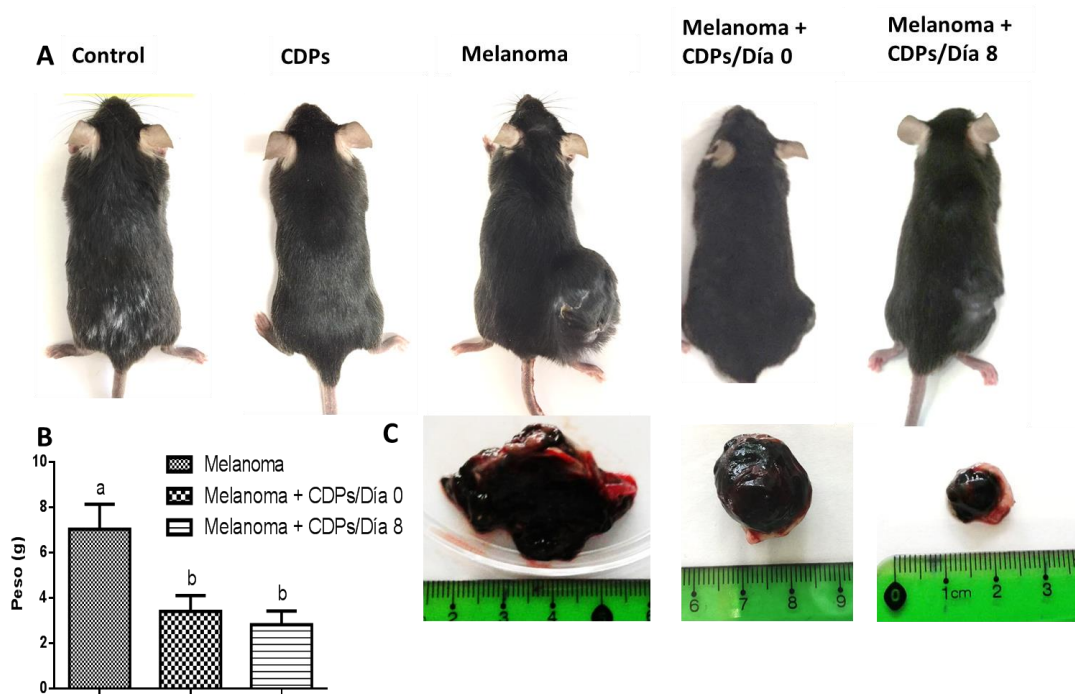


Figura 14. Peso de los tumores al término del tratamiento con CDPs. Una vez concluido el tratamiento (4 semanas) se sacrificaron los ratones de los diferentes grupos, se obtuvieron los tumores y se pesaron. A) Fotografías representativas de ratones pertenecientes a cada uno de los grupos; B) grafica 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.

7.5. Efecto de los ciclodipeptidos en el peso de tumores y órganos de los ratones C57BL/6.

El peso de los tumores en ratones sin tratamiento alcanzó un promedio de 7 g, mientras que en los grupos con tratamiento el peso reportado fue de aproximadamente 3.5 g, es decir, los CDPs disminuyeron el tamaño de los melanomas en un 50% (figura 14B) tal diferencia fue notoria incluso a simple vista, como se muestra en las figuras 14A y 14C, con fotos representativas de los ratones que desarrollaron melanoma antes del sacrificio y fotos de los tumores extraídos, respectivamente.

En cuanto al peso de los órganos, fueron pesados corazón, pulmones, riñones, hígado y bazo de todos los ratones y se graficó la relación de peso del órgano entre el peso corporal del ratón para una estimación más certera del cambio en el peso observado solamente en el bazo (figura 16), el peso del bazo aumento significativamente a casi el doble de su tamaño normal en ratones que desarrollaron los melanomas, sin embargo cuando se sometieron al tratamiento, el peso del bazo fue casi restablecido al peso del grupo control (ratones sanos sin tratamiento). El crecimiento del bazo en el grupo con melanoma se correlaciona con el cuadro de anemia observado por la disminución de valore sanguíneos en este mismo grupo. Los demás órganos mostraron un peso similar entre los diferentes grupos.

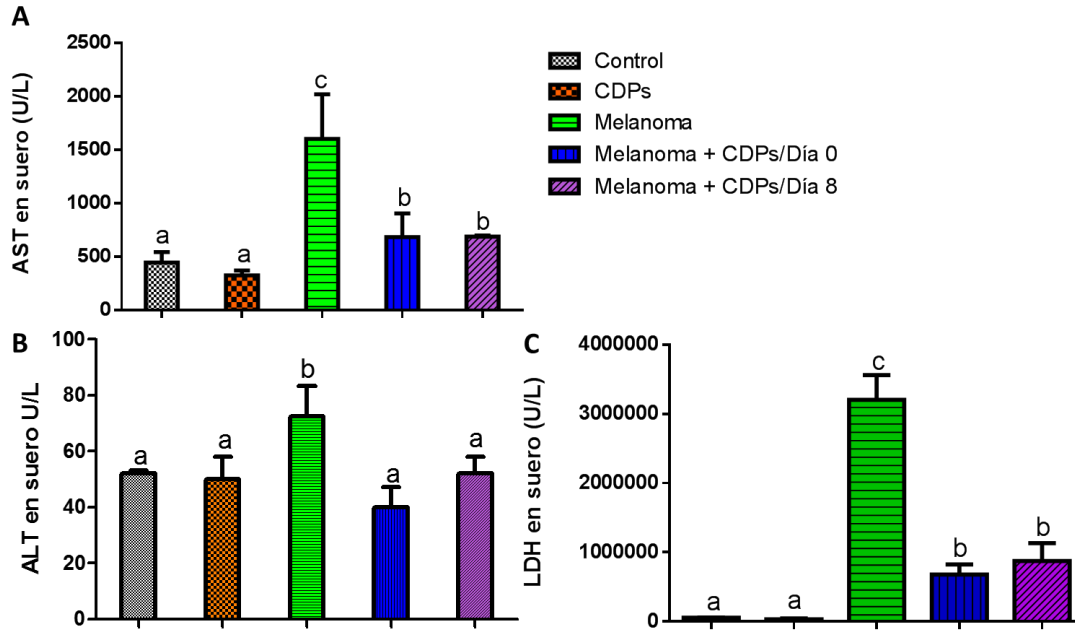


Figura 15. Marcadores de función hepática y marcador tumoral en ratones con melanoma. Una vez concluido el tratamiento con ciclodipéptidos y sacrificados los ratones de los diferentes grupos se obtuvo el suero sanguíneo para la determinación de A) y B) aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, respectivamente como marcadores de función hepática; c) Lactato deshidrogenasa como marcador tumoral en melanoma. 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. Control = grupo sin inducción de melanoma y sin tratamiento con CDPs; CDPs= grupo sin melanoma y administrado con los ciclodipéptidos; Melanoma = grupo inducido con melanoma sin tratamiento; CDPs/Día 0 = grupo tratado con ciclodipéptidos desde que se implantaron las células de melanoma; CDPs/Día 8 = grupo tratado con ciclodipéptidos a partir de que el melanoma fue visible.

7.6. Evaluación de los niveles séricos de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) como marcadores de función hepática y lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador tumoral en ratones con melanoma y tratados con ciclodipéptidos.

Cuando concluyo el tratamiento se sacrificaron los ratones y se obtuvo suero sanguíneo como se indica en los materiales y métodos. La cuantificación de AST, ALT y LDH se realizó usando un equipo Analizador Automatizado de Química Seca Vitros 350, cabe mencionar que esta técnica tiene la ventaja de descartar la interferencia de hemolisis en las muestras de ratones que tenían anemia severa. Los resultados indican que el efecto antiproliferativo de los CDPs observando una significativa disminución del tamaño de los tumores se correlaciona con la disminución de los valores séricos de LDH.

Respecto a las enzimas de función hepática solo se vio una elevación significativa de la AST en los ratones con melanoma que no fueron tratados, de casi el triple del valor normal

(aprox. 1500 U/L, mientras que en los grupos con tratamiento los valores apenas se aproximaron a las 700 U/L, aún más importante en el grupo sin melanoma y sometido a tratamiento con los CDPs mantuvieron valores de ambas enzimas iguales que el control (470 U/L). Esto en conjunto, demuestra que los CDPs contrario a ocasionar un daño a otros órganos como el hígado ejerce una acción positiva sobre la salud de los ratones con melanoma (figura 15).

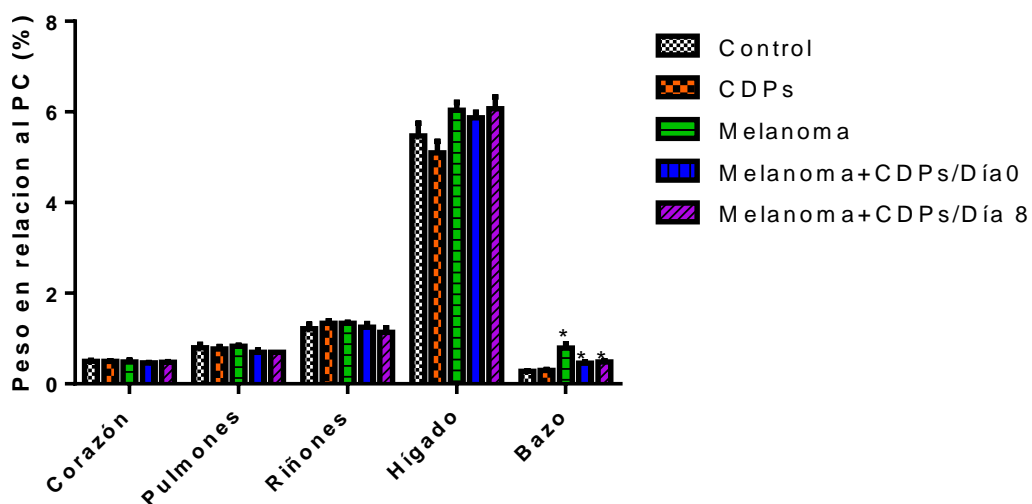


Figura 16. Peso de los órganos de ratones inducidos con melanoma. Una vez concluido el tratamiento con ciclodipéptidos y sacrificados los ratones de los diferentes grupos se pesaron los órganos: Hígado, bazo, corazón, pulmones y riñones. Las barras representan media \pm error estándar de un experimento, $n = 6$. 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. Control = grupo sin inducción de melanoma y sin tratamiento con CDPs; CDPs = grupo sin melanoma y administrado con los ciclodipéptidos; Melanoma = grupo inducido con melanoma sin tratamiento; CDPs/Día 0 = grupo tratado con ciclodipéptidos desde que se implantaron las células de melanoma; CDPs/Día 8 = grupo tratado con ciclodipéptidos a partir de que el melanoma fue visible.

7.7. Análisis histológico de melanomas y órganos de ratones tratados con los ciclodipéptidos.

Una vez obtenidos los tumores, fueron fijados en PFA 4% en refrigeración para posteriormente realizar cortes en parafina de 5 micras, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se tomaron fotografías de diferentes campos representativos de cada tumor, se fotografió cada campo a aumentos de 10x, 40x y 100x. En la figura 17 se muestran las diferencias encontradas entre los melanomas con y sin tratamiento, primero en el melanoma sin tratamiento (izquierda) se observan características propias del melanoma como células pleomórficas, con poca matriz extracelular y con una gran cantidad de

pigmento melánico, en el centro (melanoma con tratamiento desde el inicio) se muestra una marcada pérdida de la continuidad del tejido, encogimiento de los núcleos e incluso se muestran algunos que parecen estar fragmentados, características que podrían sugerir células apoptóticas. Estas características son más pronunciadas en el tratamiento desde el día 8 donde se hacen evidentes mayor cantidad de núcleos fragmentados y marcadas áreas con disminución del pigmento melánico. Para la histología de órganos se siguió la misma metodología que para los tumores, esto se hizo con la finalidad de complementar los datos de las enzimas hepáticas y datos sanguíneos para corroborar que los tejidos no estuvieran dañados. En la figura 18A se muestran cortes de pulmón de los diferentes grupos, se puede ver en todos los casos la integridad de los alveolos y bronquiolos, no se muestran alteraciones aparentes en este tejido. El tejido hepático (figura 18B) se pueden ver los hepatocitos intactos en su disposición radial normal alrededor de arterias centrilobulillares, también se pueden apreciar algunas células de Kupffer, sin diferencias evidentes entre los diferentes grupos y por último en la figura 18C fotografías de tejido esplénico donde tampoco se destacan diferencias entre los grupos, más que una gran cantidad de filtración de eritrocitos. Según los resultados del peso del bazo que mostraron un importante aumento del tamaño de este órgano en ratones con melanoma, esperábamos encontrar a nivel histológico un daño importante, y a pesar de que no fue así no podemos descartar que a hiper función del bazo por la presencia del tumor pueda generar daño importante en este órgano, por lo que hacen falta ensayos de histología más detallados.

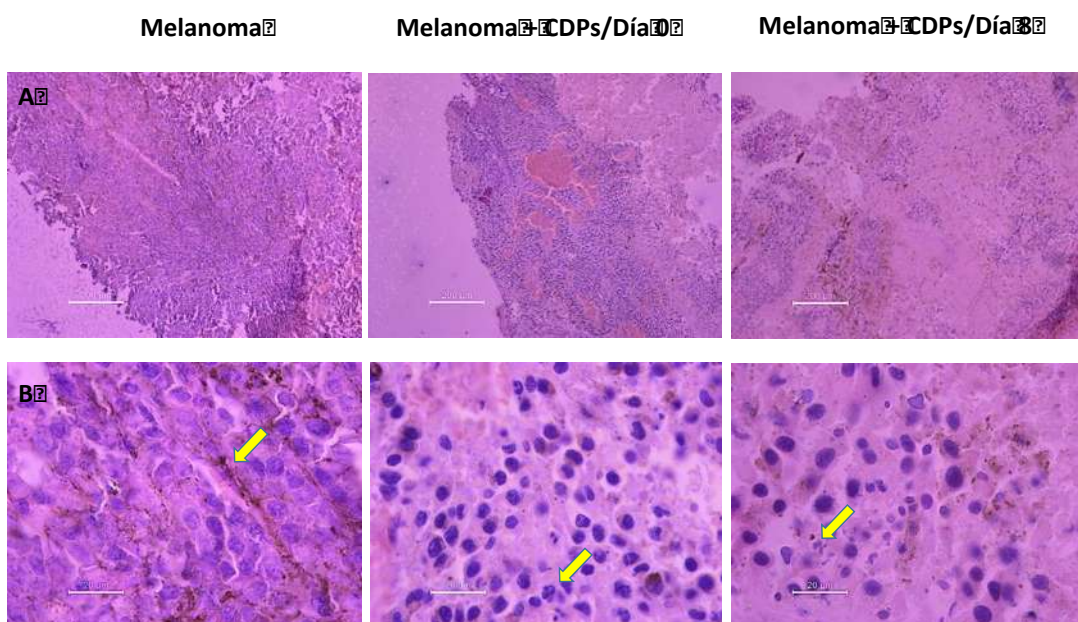


Figura 17. Histología de tumores de ratones tratados con los ciclodipeptidos. Se muestran fotografías representativas tomadas a objetivo 10x (A) y 40x (B) donde se muestran diferencias en la morfología de las células de melanoma, las flechas indican presencia de abundante pigmento melánico (izquierda), cambio en la morfología nuclear de apariencia fragmentada (centro) y pérdida de la cohesión celular (derecha). Tinción Hematoxilina-Eosina.

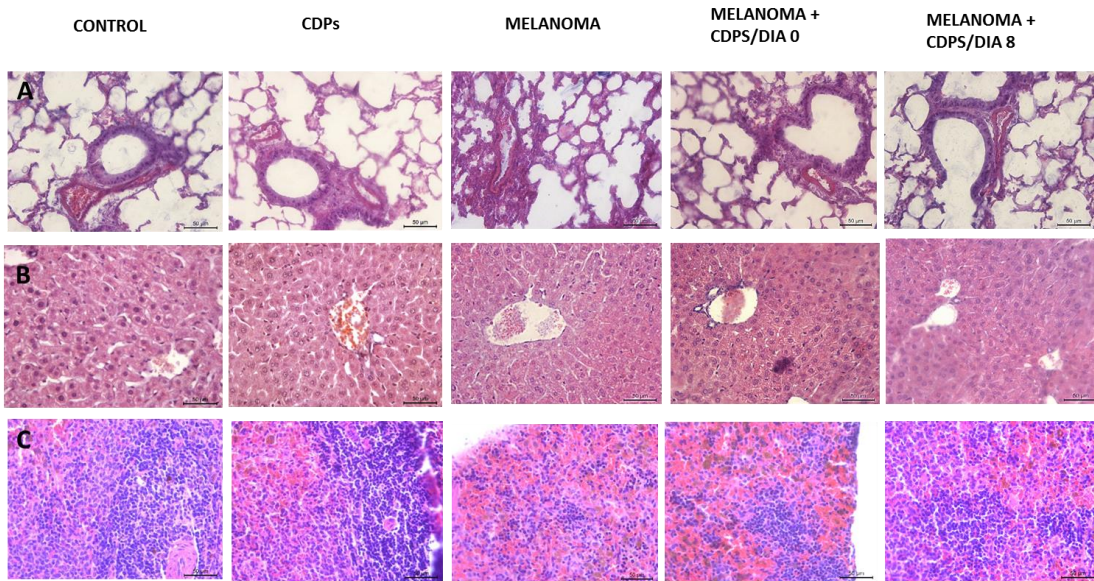


Figura 18. Histología de los órganos de ratones inducidos con melanoma y tratados con los CDPs. Se extrajeron los órganos de los ratones una vez terminado el tratamiento y se realizaron cortes en parafina (5micras). Las fotografías representativas no mostraron diferencias evidentes a nivel tejido entre los diferentes grupos. A) pulmón; B) hígado y; C) bazo. Objetivo 40x. Tinción H-E. Tinción Hematoxilina-Eosina.

7.8. Efecto de los ciclodipeptidos sobre la expresión de proteínas que participan en vías de señalización que favorecen el desarrollo del tumor

Con la finalidad de elucidar el mecanismo de los CDPs para el efecto anti proliferativo realizamos inmunodetección en tándem de varias proteínas involucradas en el fenotipo canceroso usando un micro arreglo para detectar la expresión de 19 proteínas de las cuales PCNA, p27/kip1, N-cadherina, survivina, HIF-1alfa y Met, mostraron un aumento importante en el melanoma sin tratamiento y disminuyeron cuando se trató el tumor con CDPs. Esas proteínas están involucradas en procesos clave para la progresión del cáncer, tales como la supervivencia y resistencia a la muerte celular, regulación del metabolismo energético, promoción de la angiogénesis, invasión y metástasis (figura 19). En conjunto de todos nuestros resultados nos ayudan a proponer un modelo de mecanismo para el efecto anti cancerígeno de los ciclodipeptidos (figura 20) y nos dan pauta para estudiar más afondo estos prometedores compuestos con potencial anticancerígeno.

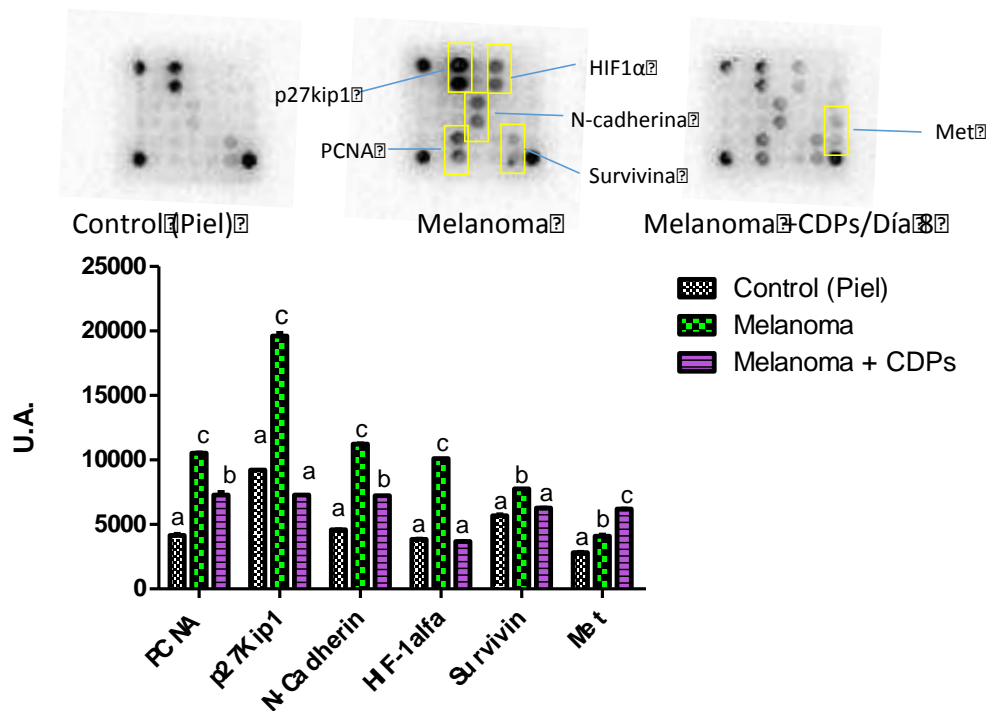


Figura 19. Efecto de los CDPs en la expresión de proteínas de vías involucradas en el fenotipo canceroso. Se lisaron muestras de tumor y se obtuvo la proteína total del lisado para inmunodetección en tándem A) fotografías representativas de la inmunodetección con microarreglos (PathScan Cancer Phenotype Antibody Array Kit, Cell signaling Technology); B) Determinación de la intensidad de la señal de los puntos del microarreglo por densitometría usando el software Image J. Las barras representan la media de dos ensayos independientes, n= 3. Se realizó ANOVA una vía, prueba de Tukey, la significancia estadística ($P < 0.05$) de las diferencias entre tratamientos se indica con letras diferentes.

8. DISCUSIÓN

Previamente hemos descrito el efecto citotóxico de los CDPs en las líneas cancerosas HeLa y CaCo-2 mediante inducción de apoptosis intrínseca a través de la vía PI3K/Akt/S6k mostrando especificidad por células cancerosas (Vazquez- Rivera et al., 2016; Hernandez-Padilla et al., 2017) posicionando a estas novedosas moléculas como potencial opción terapéutica anti-cáncer. En este trabajo evaluamos tal efecto de los CDPs en un modelo *in vivo* de melanoma, utilizando la cepa de ratones C57BL/6 y la línea singénica de melanoma murino B16/F0. Éste modelo es ampliamente utilizado para la evaluación de la efectividad y seguridad de diversas terapias anti-cáncer, ya que la utilización de ratones inmunocompetentes representa diversas ventajas en comparación con modelos experimentales con ratones inmunosuprimidos que requieren de cuidados especiales que garanticen evitar la exposición a agentes infecciosos. Además, el melanoma es uno de los tipos de cáncer más agresivos y que constantemente presenta resistencia a diversos quimioterapéuticos.

En primer lugar, evaluamos el efecto de los CDPs en el modelo de melanoma *in vitro* y observamos que estos compuestos afectan la viabilidad de las células B16/F0 mediante la inducción de apoptosis en una manera dosis dependiente obteniendo como EC_{50} 0.0126 mg/mL, esto representa 5 veces más bioactividad en la línea de melanoma que en lo previamente reportado en nuestro grupo de trabajo con la línea HeLa.

Una vez observado el efecto citotóxico de los CDPs en las células B16/F0 realizamos ensayos *in vivo* para evaluar el efecto de nuestros compuestos en un modelo de inducción de melanoma en ratones C57BL/6. Nosotros monitoreamos el peso de los diferentes grupos de ratones diariamente observando un mayor aumento del peso corporal en los grupos inducidos con tumores con y sin tratamiento, mientras que los grupos control y control con CDPs mostraron una ganancia de peso similar, dicha diferencia en la ganancia de peso de los grupos se debió a el crecimiento del tumor inducido con las células de melanoma. El diseño de tratamiento que realizamos fue con la finalidad de evaluar si los CDPs tienen efecto en etapas tempranas y/o avanzadas del tumor; por lo cual a un grupo de ratones con tumor se le administró el tratamiento desde que se colocó el implante de células cancerosas y a otro grupo se le inició el tratamiento hasta que el tumor fue detectable por palpación.

En cuanto al volumen tumoral encontramos que los melanomas en ratones tratados con 100 mg/kg de peso de los CDPs mostraron una significativa disminución del volumen tanto en el grupo tratado desde el inicio con un volumen promedio de aproximadamente 1.5 cm^3 , así como en el grupo tratado a partir de que los tumores fueron visibles (8° día) con un volumen aproximado de 10.0 cm^3 respecto al grupo no tratado que mostro un volumen de $\sim 5 \text{ cm}^3$ e incluso, de manera importante, observamos la desaparición total del melanoma en algunos ratones cuando fueron tratados con los CDPs usando como vehículo las α -ciclodextrinas.

Se sabe que varios tratamientos quimioterapéuticos pueden ocasionar efectos secundarios importantes en fases preclínicas, por ejemplo, pérdida de cabello, pérdida de apetito y consecuente pérdida de peso, así como daño secundario en diferentes tejidos sanos (National Cancer Institute, NCI). Por ello también se determinó el peso del corazón, pulmones, riñones, hígado y bazo de los diferentes grupos experimentales obteniendo una diferencia significativa solo en el caso del bazo, siendo que los grupos inducidos con tumores presentaron un aumento de eso en este órgano respecto a los grupos sin tumor, mientras que el peso de los demás órganos se mantuvo similar en todos los grupos. Se ha reportado un aumento en el tamaño del bazo en pacientes oncológicos, que puede deberse a un aumento en la filtración de células tumorales o un incremento en la filtración de glóbulos blancos por un cuadro de inflamación crónica o glóbulos rojos dañados.

debido a la común aparición de un cuadro de anemia por la presencia de la neoplasia, lo cual se corrobora en el análisis histopatológico de dicho órgano, observando un claro aumento en la cantidad de glóbulos rojos en el tejido.

De manera importante cabe resaltar que en el grupo de ratones sanos administrados con CDPs no se observaron signos evidentes de toxicidad de estos compuestos que se reflejarían desde cambios en la ganancia de peso hasta cambios macro y microscópicos en los diferentes órganos evaluados. Con estos resultados podemos proponer que los CDPs poseen efecto anti-cáncer en este modelo de melanoma y que al menos la concentración usada en este trabajo no genera efectos adversos en los ratones. Esto es de mucha importancia en el diseño de las terapias anti-cáncer, pues las terapias convencionales más conocidas tienen la desventaja de producir efectos adversos como náuseas, pérdida de peso, cefalea, inmunosupresión, anemia, etc., (Instituto Nacional del Cáncer).

Por otra parte, los parámetros sanguíneos junto con los marcadores tumorales son utilizados como pruebas clínicas que acompañan el historial de pacientes oncológicos pues si ven desde la sospecha, diagnóstico y monitoreo de la progresión del tumor, así como la efectividad del tratamiento administrado y el seguimiento de los pacientes con regresión del cáncer. En nuestro modelo, observamos niveles significativamente bajos tanto de hemoglobina como de hematocrito en los grupos inducidos con tumor respecto a los grupos sin tumor. Sin embargo, se muestra un importante restablecimiento de estos valores sanguíneos en los grupos tratados con los CDPs en comparación con el grupo no tratado. La disminución de los valores sanguíneos en conjunto con el aumento del tamaño del bazo son indicativos de un estado importante de anemia, cuadro comúnmente mostrado por pacientes con neoplasias (Dela D, 2005). Con estos resultados podemos decir que el tratamiento con CDPs lejos de tener un efecto tóxico en los ratones son benéficos, ya que la disminución del tumor va acompañada de un mejoramiento en el estado general de salud.

También medimos marcadores séricos de función hepática obteniendo una elevación de los valores de AST en los ratones con tumor, los cuales disminuyeron significativamente cuando fueron tratados con los CDPs, incluso acercándose a los valores de AST en el grupo control, en cuanto a la enzima ALT no se observó un cambio significativo entre los diferentes grupos. Interesantemente el grupo sin tumor con CDPs mostro valores de ALT y AST similares al grupo control indicando que estos compuestos no son tóxicos a la concentración de 100 mg/kg de peso, lo cual habla de la seguridad y especificidad de blanco de los CDPs al ser usados como compuestos anti-cáncer.

En cuanto a la LDH como marcador tumoral, se han observado cifras muy elevadas de esta enzima a nivel sérico en pacientes con diferentes tipos de cáncer, entre ellos el melanoma y se sabe que hay una estrecha relación entre la cantidad de LDH y el estado de progresión del cáncer, por lo cual se utiliza como valor pronóstico y para evaluar la efectividad del tratamiento o casos de reincidencia después de extirpación del tumor. La LDH aumenta debido al metabolismo anaeróbico característico de células cancerosas (Efecto Warburg), lo cual hace que a medida que crece el tumor aumenten los niveles de LDH (Sanjiv S et al., 2009). Nuestros resultados mostraron una importante disminución de hasta 5 veces menos de este marcador tumoral tanto en el grupo con tratamiento desde el inicio como en el grupo tratado desde el día 10 post inducción en comparación con el grupo no tratado, por otra parte los niveles de esta enzima en el grupo control con CDPs se mantuvieron similares al control, los resultados del monitoreo del crecimiento de los tumores usando LDH como marcador tumoral demuestran el efecto anti cáncer de los CDPs.

Al analizar los tumores a nivel histológico observamos que en los grupos tratados con CDPs hay un encogimiento de las células y una notoria fragmentación nuclear, así como pérdida de las uniones intercelulares lo cual podría representar características de la muerte por apoptosis. También se observó una ligera disminución del pigmento melánico característico de este tipo de tumor respecto al grupo sin tratamiento.

Para tener una idea de las vías sobre las que actúan los CDPs para inducir el efecto antiproliferativo, realizamos una inmunodetección en tándem que muestra un total de 19 proteínas cuya expresión se ve afectada cuando hay transformación maligna de las células, utilizando como control piel de ratones sanos.

De las 19 proteínas evaluadas en el micro arreglo solo hubo cambios en la detección de PCNA, p27/kip1, N-Caderina, HIF1 α , survivina y Met, que se mostraron aumentadas en el melanoma comparado con el patrón de proteínas en la piel sana de ratón, las cuales disminuyeron significativamente cuando el melanoma fue tratado con los CDPs.

PCNA es un marcador de proliferación, corresponde a un antígeno nuclear presente en las fases S y G2 del ciclo celular (H Malkas et al., 2006) y es usado para determinar el índice proliferativo en biopsias de tumores, ya sea para detección e identificación de la neoplasia o para evaluar la efectividad de un tratamiento. Los resultados que obtuvimos indican que los CDPs disminuyen la tasa proliferativa del melanoma en ratones C57BL/6.

Por su parte P27kip1 es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas cuyo principal rol aceptado es como regulador del ciclo celular y catalogado en este contexto como gen supresor de tumores por inhibición de CDks en el núcleo, sin embargo se sabe que ejerce funciones potencialmente oncogénicas mediante la porción c-terminal en el citoplasma y cuyas funciones en este sitio pueden incluir regulación del citoesqueleto de actina y migración celular a través de la modulación de la actividad de RhoA (Besson et al., 2004; Batsi et al., 2009). Gao et al., 2004) (Kim et al., 2005; Susaki et al., 2009). Esto concuerda con los resultados de nuestro estudio, donde P27/kip1 parece estar participando en el desarrollo del melanoma, viéndose disminuido en los melanomas tratados con los CDPs.

Una característica común de los cánceres de origen epitelial es la expresión aumentada de N-Cadherina y desregulación concomitante de E-Cadherina (the cadherin switch). Este fenómeno es correlacionado con potencial metastásico e invasividad adquirida por las células cancerosas, este fenómeno (transición epitelio-mesénquima, TEM) ha sido observado en biopsias de varios tipos de cáncer incluyendo melanoma, pulmón y próstata. El mecanismo por el cual la expresión incrementada de N-Cadherina promueve la malignidad no está completamente comprendida, pero se ha visto in vitro que células de melanoma expresando N-cadherina se adhieren y migran sobre fibroblastos y este fenómeno se inhibe por anticuerpos que bloquean la función de N-cadherina.

N-cadherina puede promover la supervivencia, migración e invasividad a través de la TEM. A pesar de que la línea B16/F0 utilizada en nuestra investigación tiene bajo potencial metastásico, se observó un importante aumento en la expresión de N-cadherina posiblemente debido a la agresividad de este tipo de cáncer, dicha expresión se vio disminuida por el tratamiento con los CDPs lo cual podría ser prometedor para el tratamiento de tumores agresivos para retrasar el desarrollo de metástasis, sin embargo, es necesario corroborar este efecto en un modelo de metástasis.

Por otro lado, HIF1 α es una subunidad de la proteína heterodimérica HIF1 que funciona como factor de transcripción regulando procesos como supervivencia, apoptosis, metabolismo de glucosa y angiogénesis. Se sabe que la regulación de HIF1 está estrechamente relacionada con la vía PI3K/Akt/mTOR e incluso de ha demostrado que Akt y HIF1 interactúan sinérgicamente durante el desarrollo del melanoma (Barbara Bedogni, 2005). La expresión de HIF aumenta cuando se detecta un ambiente hipóxico (<5% O₂) y regula el cambio metabólico de las células a un metabolismo preferentemente glicolítico anaeróbico aun en condiciones de normoxia (21% O₂). Esto sumado a la disminución del lactato deshidrogenasa (LDH) sugiere un importante efecto de los CDPs sobre el metabolismo energético de las células tumorales que compromete a su vez la regulación

de diversas vías que ayudan a las células tumorales a sobrevivir, promover angiogénesis y diseminarse a otros tejidos.

Survivina es una proteína que pertenece a la familia de inhibidores de apoptosis (IAPs) y puede expresarse en núcleo, mitocondria y citosol regulando procesos que favorecen el desarrollo de tumores cancerosos como inhibición de apoptosis, promoción de metástasis y quimioresistencia (Himani Garg et al., 2016; Wang P et al., 2012; McKenzie JA et al., 2012). Por otra parte, Song y colaboradores han demostrado que survivina se une físicamente a SMAC/DIABLO y bloquea su interacción induciendo así apoptosis en células HeLa tratadas con Taxol, pero se sabe que también lo puede hacer mediante inhibición de caspasa 9. La disminución de esta proteína en el lisado de melanoma tratado con los CDPs concuerda con los observados en melanoma in vitro, donde hay inducción de la apoptosis y con las características morfológicas observadas en la histología de los tumores que parecen presentar signos de muerte por apoptosis.

Por último, Met es un receptor que generalmente se relaciona con su principal ligando factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) durante el desarrollo embrionario sin embargo responde a diversos estímulos, y se sabe que en el contexto del cáncer participa en el crecimiento invasivo, siendo clasificado como oncogén. Met puede activar diversas vías de señalización entre ellas PI3K ya sea directamente o a través de Ras. También puede ser regulada la tensión de oxígeno en los tejidos a través de la unión de HIF1 al promotor de Met (Alessandra Gentile, 2008; Takami T et al., 2007; Royal I y Park M, 1995). Nosotros observamos que este receptor, a diferencia de las demás proteínas, aumentó su expresión cuando se dio tratamiento con los CDPs, resultado contrario a lo reportado en la literatura, sin embargo, el hecho de ser un receptor y estar relacionado con vías anteriormente estudiadas y que se ha visto que se afectan por acción de los CDPs como PI3K/ Akt; este efecto podría significar un indicio de cómo interactúan los CDPs inicialmente con las células cancerosas. Estos resultados demuestran que los CDPs administrados como tratamiento para melanoma en modelo murino, disminuyen el crecimiento del tumor vía inhibición de vías de señalización relacionadas con el metabolismo de la glucosa, supervivencia, proliferación e incluso invasión y angiogénesis.

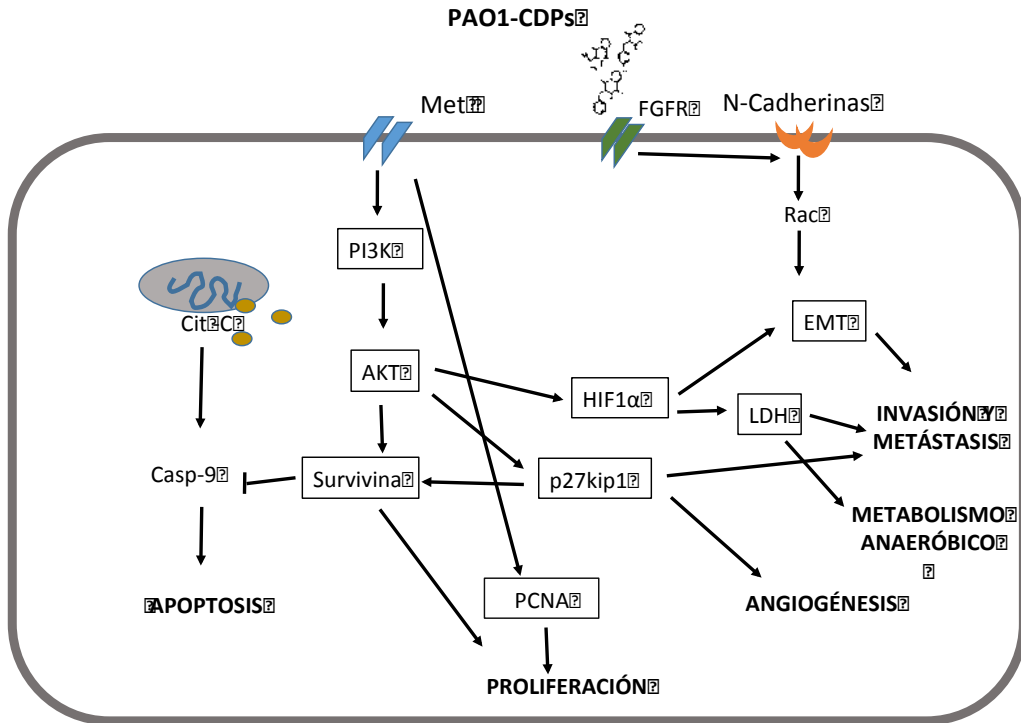


Figura 20. Mecanismo de los CDPs para producir un efecto antiproliferativo en un modelo *in vivo* de melanoma murino. En el melanoma hay una acelerada proliferación y resistencia a la muerte celular, así como una alta expresión de HIF1 α que regula desde el metabolismo energético (efecto Warburg) que se acompaña de un marcado aumento de la LDH, hasta inducción de la angiogénesis y promoción de la invasión y metástasis. Cuando se da tratamiento con los CDPs los niveles de las proteínas que participan disminuyen significativamente lo que representa una inhibición de las vías de proliferación, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis y permitiendo que ocurra la muerte celular por apoptosis.

9. CONCLUSIÓN

La mezcla de ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 presentaron un efecto antitumoral en el modelo *in vivo* de melanoma murino.

BIBLIOGRAFÍA

Agarwala S.S. di Pietro A, Flaherty K.T, Garbe C, Grob J-J, Kashani-Sabet M, Kirkwood J.M, Leachman S, Messina J, O'Day S, Ribas A, Sondak V. 2010. Meeting report from the third global workshop on melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23: e1-e7.

Agnese Mariotti, Antonella Perotti, Cristiana Sessa and Curzio Rüegg . 2007. N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 1354-3784.

Alessandra Gentile & Livio Trusolino & Paolo M. Comoglio. 2008. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metástasis Rev.* 27:85–94.

Barbara Bedogni, Scott M. Welford, David S. Cassarino, Brian J. Nickoloff, Amato J. Giaccia, and Marianne Broome Powell. 2005. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell.* vol8 450-451.

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

Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* 2004; 18:862-76

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

Cella D. 2005. Erythropoietin alfa improves quality of life versus placebo in anemic patients with cancer. *J Clin Oncol.* 19(21):4126-4134.

Cooper G y Hausman R. 2010. *La célula* 5^{ta} Edición 1: 818.

Dalton Dittz et al (2015) Antiangiogenesis, Loss of Cell Adhesion and Apoptosis Are Involved in the Antitumoral Activity of Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) in Murine Melanoma B16F1. *Int J Mol Sci.* 16(4): 7027–7044.

Deep G, Jain AK, Ramteke A, Ting H, Vijendra KC, Gangar SC,. 2014 SNAI1 is critical for the aggressiveness of prostate cancer cells with low E-cadherin. *Mol Cancer.* 13:37.

Denninghoff V, Falco J, Curutchet H.P, Elsner B. 2006. Estudio del ganglio centinela, diagnóstico y tratamiento del melanoma maligno cutáneo, estadíos I y II. *Medicina (Buenos Aires)* 66: 144-146.

Fisher DE, Medrano EE, McMahon M, Soengas MS, Schuchter L, Wolchok JD, Merlino G. 2008. Meeting report: fourth international congress of the Society for Melanoma Research. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21(1):15-26.

Gao H, Ouyang X, Banach-Petrosky W, Borowsky AD, Lin Y, Kim M, Lee H, Shih WJ, Cardiff RD, Shen MM, Abate-Shen C. 2004. A critical role for p27Kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17204-9.

García-Hernández, M.L. Hernández-Pando.P.Gariglio.P.Berumen,J. 2002. Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Inmunology.* 105, 231-243.

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

Graziani, A., Gramaglia, D., Cantley, L. C., & Comoglio, P. M. 1991. The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/ scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3- kinase. *Journal of Biological Chemistry,* 266, 22087–22090.

Gumbiner BM. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84(3):345-57.

Hanahan D, Weinberg RA.2000. The hallmarks of cancer *Cell (Cell)* 100(1):57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*144(5):646-74.

Hazan RB, Qiao R, Keren R et al. 2004. Cadherin switch in tumor progression. *Ann. NY Acad. Sci.* 1014:155-163.

Hermida Lazcano. 2016. Marcadores Tumorales. *REV CLÍN MED FAM;* 9(1): 31-42.

Himani Garg, Prerna Suri, Jagdish C. Gupta, G. P. Talwar and Shweta Dubey. 2016. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell International.* 16:49 3-5.

Hoskin y Ramamoorthy (2008). *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1778: 357-375.

Hussein MR. 2008. Extracutaneous malignant melanomas *Cancer Invest.* 26(5):516-34.

Juan Li, Shuchai Zhu, Jing Tong, Hui Hao, Jie Yang, Zhikun Liu and Yuxiang Wang. 2016. Suppression of lactate dehydrogenase A compromises tumor progression by downregulation of the Warburg effect in glioblastoma. *Neuro Report* 27:110–115

Kashami-Sabet M. 2008. Skin cancer: Melanoma. *On the Knol* (July 24), page 1-8.

Knapen MF, Mulder TP, Bisseling JG, Penders RH, Peters WH.1998. Plasma glutathione S-transferase alpha 1-1: a more sensitive marker for hepatocellular damage than serum alanine aminotransferase in hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynecol.*178(1 Pt 1):161-5. PubMed.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. 2003. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer.* 89(5):877 – 885.

Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression. 2014 *Expert Opin. Investig. Drugs.*

Linda H. Malkas, Brittney Shea Herbert, Waleed Abdel-Aziz, Lacey E. Dobrolecki, Yang Liu, et al. 2006. A cancer-associated PCNA expressed in breast cancer has implications as a potential biomarker. *PNAS.* vol. 103 no. 51 19472–19477.

Lorena Lobos-González, Lorena Aguilar, Gonzalo Fernández, Carlos Sanhueza, Andrew F.G Quest. Caveolin-1 in melanoma progression *Melanoma Book 3*, 2011.

Mariotti, Perotti, Sessa & Rüegg *Expert Opin. Investig. Drugs* (2007) 16(4) 463 in superficial urothelial tumors. *Clin. Cancer Res.* (2006) 12(9):2780-2787.

McKenzie JA, Gossman D. 2012. Role of the apoptotic and mitotic regulator Survivin in melanoma. *Anticancer Res.* 32(2):397–404.

Meng et al. 2012. *Cancer and Metastasis Reviews* 31: 247-268.

Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, Prichard JG. 2003. Serum Tumor Markers. *Am Fam Physician.* 68 (6): 1075-82.

Ponzetto, C., Bardelli, A., Maina, F., Longati, P., Panayotou, G., Dhand, R., et al. 1993. A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Molecular Cell Biology*, 13, 4600–4608.

Rizzo D. 2002. Use of erythropoietin in cancer: evidence based clinical practice guidelines of ASCO and ASH. *J Clin Oncol.* 20:4083-41.

Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. 2002. Differential expression of the epithelial–mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am. J. Pathol.* 161(5):1881-1891.

Royal, I., & Park, M. 1995. Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin–Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 27780–27787

Sanjiv S. Agarwalaa, Ulrich Keilholzb, Erard Gillesc, Agop Y. Bedikiand, Jane Wuc, Richard Kaye, Cy A. Steinf, Loretta M. Itric, Stefan Suciug, Alexander M.M. Eggermonth. 2009. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951) *European Journal of Cancer* 45; 1807–1814.

Sarrio D, Moreno-Bueno G, Sánchez-Esteves C et al. 2006. Expression of cadherins and catenins correlates with distinct histologic types of ovarian carcinomas. *Hum. Pathol.* 37(8):1042-1049.

Song Z, Yao X, Wu M. 2003. Direct interaction between Survivin and Smac/ DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of Survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 278(25):23130–40.

Susaki E, Nakayama K, Yamasaki L, Nakayama KI. Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;31:5192-7.

Teresa Romero G, Casado Vicente V, Jimeno Carrúez A. 2002. Utilización de marcadores tumorales en Atención Primaria. *Medifam [revista en la Internet]*. 2002. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682002000100003&lng=es.

Tumor Markers. National Cancer Institute [Consultado 2016 Ene 16]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>.

Wang P, Zhen H, Zhang J, Zhang W, Zhang R, Cheng X, Guo G, Mao X, Wang J, Zhang X. 2012. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo. *Mol Carcinog.* 51(7):586–95.

Weinberg RA .1989. Oncogene, antioncogene, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49(14): 3713-3721.

Yanagimoto K, Sato Y, Shimoyama Y et al. 2001. Co-expression of N-cadherin and α -fetoprotein in stomach cancer. *Pathol. Int.* 51(8):612-618.

Zuberek et al 2003. Comparable in vivo efficacy of CD28/B7, ICOS/GL50, and ICOS/GL50B costimulatory pathways in murine tumor models: IFN γ -dependent enhancement of CTL priming, effector functions, and tumor specific memory CTL. *Cell. Immunol.* 2003;225:53–63.