



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA**

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Biotecnología Pecuaria

TESIS

Citotoxicidad del butirato en combinación con el péptido antimicrobiano γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) sobre líneas celulares de cáncer de colon

QUE PRESENTA:

Q.F.B. María Elena Velázquez Hernández

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Maestra en Ciencias Biológicas

ASESOR:

Dr. Joel Edmundo López Meza

CO-ASESORA:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Morelia, Michoacán, Marzo de 2017



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

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto 14.5) y del CONACyT (proyecto 221363 CB-2013-01 y beca 573021).

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis hijas Vanessa e Itzi. Espero que si algún día lo leen comprendan porque “siempre tenía tarea” y me la pasaba trabajando en la computadora.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de maestría (573021).

Agradezco a mi familia, por todo su apoyo y confianza. A mi esposo Roberto por animarme a ingresar a este programa de posgrado y ayudarme a salir adelante de las situaciones difíciles, por estar siempre conmigo y contribuir a mi crecimiento tanto académico, como personal. A mis padres y mis hermanas por cuidar de mis hijas en mi ausencia y compartir conmigo tantos los momentos tristes (†) como los alegres.

También quiero agradecer al Dr. Joel Edmundo López Meza y a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa por haberme dado la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y por apoyarme y guiarme durante esta etapa. Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio M3, por su apoyo y por hacer agradable mi estancia en el mismo. En especial quiero agradecer a la Dra. Jaquelina Julia Guzmán Rodríguez por capacitarme y asesorarme.

Agradezco, además de a mis asesores, a todos los doctores me impartieron clase durante la maestría: la Dra. María Guadalupe Zavala Páramo, el Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, el Dr. Horacio Cano Camacho y el Dr. Javier Ponce Saavedra, por haber compartido conmigo sus conocimientos y ayudarme a ampliar mis horizontes.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Carlos Cortés Penagos, el Dr. Sergio Gutiérrez y el Dr. Daniel Godínez Hernández gracias por sus consejos y su contribución tanto al proyecto como a mi formación académica.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ya que esta institución ha sido mi casa de estudio desde el bachillerato y me enorgullece ser parte de su comunidad de egresados.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	III
FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN	III
FIGURAS DEL CAPÍTULO I	III
FIGURAS DEL CAPÍTULO 2	IV
ABREVIATURAS Y SIGLAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer.....	1
1.2. Características de la célula cancerosa.....	2
1.3. Epidemiología del cáncer	4
1.4. Cáncer colorrectal	5
1.4.1. Epidemiología del cáncer colorrectal	8
1.5. Tratamiento del cáncer colorrectal	8
1.6. Mecanismos de muerte celular y su implicación en el cáncer.....	11
1.6.1. Apoptosis.....	12
1.6.2. Necrosis.....	15
1.6.3. Autofagia	16
1.7. Ácidos grasos de cadena corta	17
1.8. Butirato y cáncer de colon.....	17
1.9. Péptidos antimicrobianos	20
1.9.1. Péptidos antimicrobianos de plantas	21
1.9.2. Péptidos antimicrobianos con actividad anticancerosa.....	22
1.9.3. Defensinas de plantas con actividad anticancerosa	27
2. ANTECEDENTES	29
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. HIPÓTESIS	38

5.	OBJETIVOS	39
5.1.	OBJETIVO GENERAL	39
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.	RESULTADOS.....	41
	CHAPTER I. Defensin γ -Thionin from Capsicum chinense Enhances Butyrate-Induced Cytotoxicity in the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2	42
	ABSTRACT	42
	INTRODUCTION.....	43
	MATERIALS AND METHODS	44
	RESULTS.....	49
	DISCUSSION.....	53
	CONCLUSION	57
	REFERENCES.....	58
	FIGURES	64
	CAPÍTULO 2. El Péptido Antimicrobiano γ -Tionina de Chile Habanero Capsicum chinense Sensibiliza a las Células de Cáncer de Colon HCT116 hacia la Muerte Celular Inducida por Butirato.....	70
	RESUMEN	70
	INTRODUCCIÓN	71
	MATERIALES Y MÉTODOS	72
	RESULTADOS.....	78
	DISCUSIÓN	81
	CONCLUSIÓN	83
	REFERENCIAS.....	84
	FIGURAS	87
8.	DISCUSIÓN GENERAL	93
9.	CONCLUSIÓN GENERAL	99
10.	REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN

	Página
Figura 1. Modelo clásico de la carcinogénesis colorrectal.	6
Figura 2. Activación de las vías de apoptosis.....	14
Figura 3. Efectos anticancerosos del butirato.....	20
Figura 4. Estructura tridimensional de las defensinas de plantas.....	22
Figura 5. Modelos de desestabilización de la membrana plasmática por interacción con los AMP.	24
Figura 6. Estructura de la defensina γ -tionina de chile habanero.	34
Figura 7. Estrategia metodológica.....	40
Figura 8. Modelo del mecanismo de acción de la actividad conjunta de γ -tionina y butirato en las células Caco-2.	97
Figura 9. Modelo del mecanismo de acción de la actividad conjunta de γ -tionina y butirato en las células HCT116.	98

FIGURAS DEL CAPÍTULO I

	Página
Figure 1. γ -Thionin in combination with butyrate increases cytotoxicity in Caco-2 cells.	64
Figure 2. Morphological changes in Caco-2 cells treated with butyrate and AMP γ -thionin.....	65
Figure 3. γ -Thionin in combination with butyrate does not affect cell membrane integrity of Caco-2 cells.	66
Figure 4. γ -Thionin increases the butyrate induced apoptosis in Caco-2 cells.	67
Figure 5. The treatment of γ -thionin in combination with butyrate induces the same extent of caspase activity that butyrate treated cells.	68

Figure 6. γ -Thionin in combination with butyrate induces ROS generation in Caco-2 cells.....	68
Figure 7. γ -Thionin in combination with butyrate induces cell cycle arrest in Caco-2 cells.....	69

FIGURAS DEL CAPÍTULO 2

	Página
Fig. 1. El AMP γ -tionina sensibiliza a las células HCT116 hacia la muerte celular inducida por butirato.....	88
Fig. 2. La combinación del AMP γ -tionina con butirato no afecta la integridad de la membrana plasmática de las células HCT116.	88
Fig. 3. El AMP γ -tionina no incrementa la apoptosis inducida por el butirato en células HCT116.....	90
Fig. 4. El AMP γ -tionina no incrementa la activación de caspasas inducida por el butirato en células HCT116.....	91
Fig. 5. El tratamiento con el AMP γ -tionina, butirato o su combinación no induce la producción de ROS en células HCT116.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de los diferentes mecanismos de muerte celular.....	11
Tabla 2. Defensinas de plantas con actividad anticancerosa.....	28

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AMP	Péptido antimicrobiano
ANOVA	Análisis de varianza
AP	Fosfatasa alcalina
Apaf-1	Factor activador de la proteasa apoptótica
ATP	Trifosfato de adenosina
bp	Pares de bases
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CRC	Cáncer colorrectal
cv.	cultivar
DIABLO	Proteína directa de unión a IAP con bajo pl
DISC	Complejo de señales inductoras de muerte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metil transferasa
EE	Error estándar
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
h	Hora
HDAC	Histonas desacetilasas
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia-1 α
HMGB1	Proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1
HNPCC	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
IAP	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IFN	Interferón
IL	Interleucina
kb	Kilobases
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCT1	Transportador de monocarboxilato 1
min	Minuto

μM	Micromolar
mM	Milimolar
NF κ B	Factor nuclear κ B
NK	Asesinas naturales
nM	Nanomolar
PARP-1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1
PIK3	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PPAR γ	Factor proliferador de peroxisomas γ
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundo
SMAC	Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
SMCT1	Transportador de monocarboxilato acoplado a sodio 1
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
var.	Variedad
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WHO	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

El butirato es un ácido graso de cadena corta que se produce de manera natural en el colon y que tiene la capacidad de inducir apoptosis e inhibir la proliferación de las células cancerosas. Sin embargo, durante la carcinogénesis colorrectal su producción intestinal disminuye, por lo que el empleo de moléculas que contribuyan a restablecer o incrementar su actividad, es una alternativa atractiva para combatir el cáncer de colon. Por otro lado, algunos péptidos antimicrobianos (AMP) han mostrado citotoxicidad selectiva hacia células cancerosas y su empleo en combinación con otros agentes anticancerosos ha mostrado resultados favorables. En el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad inducida por el AMP γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) en combinación con el butirato sobre líneas celulares de cáncer de colon (Caco-2 y HCT116) y su mecanismo de acción. Los resultados mostraron que el tratamiento de las células durante 24 h con 3.5 μ M de γ -tionina y posterior cotratamiento con γ -tionina y butirato durante 24 o 48 h (50 mM de butirato en las células Caco-2 y 5 mM en las células HCT116), incrementó la muerte celular en comparación con los tratamientos individuales en ambas líneas celulares. El incremento en la muerte celular por efecto de la combinación en las células Caco-2 derivó del efecto apoptótico aditivo de γ -tionina y butirato, el cual fue precedido por la producción de ROS. Además, en esta línea celular, la combinación indujo arresto en la fase G1 del ciclo celular. Por otro lado, el AMP γ -tionina sensibilizó a las células HCT116 hacia la muerte celular inducida por el butirato, pero el incremento en la muerte celular no derivó de un incremento en apoptosis ni necrosis. En conclusión, el AMP γ -tionina de chile habanero incrementó la citotoxicidad inducida por el butirato en las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y HCT116 a través de diferentes mecanismos, lo cual puede depender de las características genéticas de las células, por lo que el uso de AMP en combinación con butirato puede ser una estrategia atractiva para el tratamiento de algunos tipos de cáncer de colon.

Palabras clave: cáncer de colon, péptidos antimicrobianos, *Capsicum chinense*, butirato, apoptosis.

ABSTRACT

Butyrate is a short chain fatty acid that is produced naturally in the colon and has the ability to induce apoptosis and inhibit proliferation of cancer cells. During colorectal carcinogenesis, intestinal butyrate production decreases, which favors the tumor development. Therefore, the use of molecules that help to restore the activity of butyrate or increase its cytotoxic effect is an attractive alternative against the colon cancer. On the other hand, some antimicrobial peptides (AMP) have shown selective cytotoxicity towards cancer cells and their use in combination with other anticancer agents has shown favorable results. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of the AMP γ -thionin from habanero chilli (*Capsicum chinense*) in combination with butyrate against colon cancer cell lines (Caco-2 and HCT116) and determine its mechanism of action. The results showed that treatment of cells for 24 h with 3.5 μ M γ -thionin and subsequent co-treatment with γ -thionin and butyrate for 24 or 48 h (50 mM of butyrate in Caco-2 cells and 5 mM in HCT116 cells), increased cell death compared to individual treatments in both cell lines. The increase in cell death due to the combination in Caco-2 cells resulted from the additive apoptotic effect of γ -thionin and butyrate, which was preceded by ROS production. In addition, in this cell line, the combination induced cell cycle arrest in the G1 phase. On the other hand, the AMP γ -thionin sensitized HCT116 cells to butyrate-induced cell death, but the increase in cell death did not result from increased apoptosis or necrosis. In conclusion, the AMP γ -thionin from habanero chili increased the butyrate-induced cytotoxicity in colon cancer cell lines through different mechanisms which may depend on the genetic background of the cells. Therefore, the use of AMP in combination with butyrate may be an attractive strategy for the treatment of some types of colon cancer.

Key words: colon cancer, antimicrobial peptides, *Capsicum chinense*, butyrate, apoptosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El término cáncer designa un conjunto de enfermedades que tienen en común una proliferación celular descontrolada, originada a partir de una mutación inicial, seguida de una transformación progresiva derivada de la acumulación de mutaciones, que producen alteraciones tanto genéticas como epigenéticas (1,2).

Las mutaciones ligadas al desarrollo del cáncer ocurren sobre dos clases de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular, los protooncogenes y los genes supresores tumorales. Los protooncogenes codifican para proteínas que ejercen una regulación positiva sobre la proliferación celular. Las mutaciones sobre estos genes originan a los llamados oncogenes, los cuales codifican para proteínas que generalmente presentan un aumento en su función. Por el contrario, los genes supresores tumorales codifican para proteínas que ejercen una regulación negativa sobre la proliferación celular, y sus mutaciones se traducen en proteínas con pérdida de función. El aumento en la función de los oncogenes, así como la pérdida de función de los reguladores negativos, da como resultado el incremento en la proliferación y el crecimiento celular, característicos del cáncer (3,4).

Un tercer grupo de genes involucrado con el desarrollo del cáncer son los genes de reparación, los cuales codifican para proteínas encargadas de la reparación del DNA después de la replicación o tras la exposición a algún daño. La falla en los sistemas de reparación del DNA permite la acumulación de mutaciones que favorecen la generación de células cancerosas (5).

Además de las alteraciones genéticas, se ha demostrado que las alteraciones epigenéticas tienen una importante participación tanto en el inicio, como en la progresión del cáncer (6). La epigenética se refiere al estudio de los mecanismos que alteran la expresión genética, sin alterar la secuencia primaria del DNA, e incluyen cambios en la metilación del DNA, modificaciones de las histonas y en la expresión de RNAs pequeños no codificantes (7). Además, cambios aberrantes en los patrones

de metilación del DNA así como en las modificaciones de las histonas, que incluyen acetilación, metilación y fosforilación, conducen a una expresión inapropiada de genes relacionados con la carcinogénesis (8,9).

En el cáncer, la rápida multiplicación de las células anormales da origen a la formación de tumores, que inicialmente se localizan en algún órgano o tejido, pero que posteriormente pueden diseminarse hacia otros órganos o tejidos, mediante un proceso de colonización tisular conocido como metástasis. La mayoría de muertes en pacientes con cáncer es debida a esta última (10,11).

1.2. Características de la célula cancerosa

Durante el proceso de carcinogénesis las células adquieren ciertas características comunes en todos los tipos de cáncer (11). La primera de ellas es la capacidad de mantener una señalización proliferativa sostenida. Esto deriva de diversos factores como son el incremento en el número de receptores relacionados con el crecimiento, la producción de ligandos similares a los factores de crecimiento en células vecinas, y mutaciones en receptores o en alguna proteína, río abajo, en la cascada de señalización que mantiene activa la proliferación (12).

La segunda es la evasión de supresores de crecimiento. La tasa de proliferación de las células tumorales se encuentra favorecida por la evasión de los mecanismos de regulación negativa, controlados por genes supresores tumorales como *Rb* y *p53*. La proteína *Rb* integra señales externas e internas de proliferación, decidiendo si la célula está en condiciones de progresar en el ciclo celular, en particular en la transición G1/S. Además, regula la expresión de proteínas que participan en la mitosis. Por otra parte, *p53* censa distintas formas de estrés intracelular, como daño al DNA, deteniendo el ciclo celular en la transición G1/S para permitir la reparación del daño o desencadenar la apoptosis cuando el daño es irreparable (13).

La tercera característica es la capacidad para evadir la apoptosis, o muerte celular programada. En condiciones normales, la homeóstasis en los tejidos se mantiene gracias a este proceso de muerte. Sin embargo, el incremento en la

sobrevivencia celular por evasión de apoptosis, da lugar al crecimiento tumoral. Las células cancerosas evaden la apoptosis al disminuir la actividad de las caspasas (proteasas cuya función es degradar los componentes celulares), incrementar la cantidad de proteínas antiapoptóticas y disminuir la cantidad de proteínas proapoptóticas, así como a través de la introducción de fallas en la señalización de los receptores de muerte (14).

La cuarta característica es la capacidad de invadir tejidos distantes mediante el proceso denominado metástasis. Este proceso consiste en que a partir del tumor primario, las células comienzan una invasión local, posteriormente pierden las uniones adherentes, aumentan la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular y aumentan su motilidad, por lo que pueden penetrar en vasos sanguíneos o linfáticos y una vez en circulación se adhieren a los capilares para salir de estos vasos y entrar al parénquima de tejidos distantes para iniciar la formación de pequeños nódulos de células cancerosas que crecen hasta desarrollar tumores macroscópicos (15).

La quinta característica es la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis, la cual favorece el crecimiento tumoral y la metástasis. La angiogénesis está regulada por diversas vías en las que participan factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Debido a que en el tumor las células están sometidas a cierto nivel de hipoxia, se estimula la producción de moléculas angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que favorece el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de células precursoras (16).

La sexta característica es la inmortalidad replicativa. La mayor parte de las células pueden pasar por un número limitado de divisiones celulares, ya que en los extremos de los cromosomas hay secuencias múltiples en tandem, denominadas telómeros, que se acortan progresivamente en cada división celular. En las células tumorales se expresa una proteína denominada telomerasa que adiciona segmentos repetitivos a los extremos del DNA telomérico, evitando su acortamiento y con ello permitiendo que las células puedan dividirse de manera indefinida, fenómeno conocido como inmortalización (17).

La séptima característica es la reprogramación del metabolismo energético. Las células cancerosas incrementan su consumo de glucosa y producen ácido láctico en lugar de realizar el catabolismo a través del ciclo de Krebs, ruta clave para la generación de energía en forma de ATP en las células normales no hipóxicas. Esta reprogramación es conocida como efecto Warburg, el cual confiere a las células la capacidad de cubrir la demanda energética derivada del rápido crecimiento (18).

La octava característica es la capacidad de evadir al sistema inmunológico, el cual juega un papel muy importante en el desarrollo del cáncer. La inmuno-vigilancia tumoral consiste en la detección y eliminación de células tumorales a través de elementos tanto de la inmunidad innata, como de la adaptativa. Sin embargo, debido al constante cambio antigénico de las células tumorales, éstas no son reconocidas ni destruidas por el sistema inmune, además de que se ha visto que las células tumorales pueden inducir una activación crónica de células de la inmunidad innata en el microambiente del tumor que puede promover su crecimiento (19).

El desarrollo de todas estas características se ve favorecido por la presencia de un estado inflamatorio crónico al inicio de la carcinogénesis y de la inestabilidad genómica, que genera la acumulación de mutaciones que permiten la progresión del tumor (11).

1.3. Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La Agencia Internacional para la Investigación sobre cáncer a través del proyecto GLOBOCAN 2012 reportó que se habían producido 8.2 millones de fallecimientos derivados del cáncer en ese año, lo que representaba el 15% del total de muertes a nivel mundial, y que se habían detectado 14.1 millones de nuevos casos. Debido a que estas cifras han ido en aumento en los últimos años, se estima que para el año 2025 habrá alrededor de 20 millones de casos nuevos al año (20,21).

La Organización Mundial de la Salud (WHO) señaló que, a nivel mundial en 2012 los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado

fueron los más comunes entre los varones, mientras que entre las mujeres fueron los tumores malignos de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago (22).

La prevalencia de este conjunto de enfermedades es cada vez mayor en países en desarrollo, debido en cierta medida a que la población adquiere estilos de vida sedentarios y hábitos poco sanos como el tabaquismo, la ingesta de alcohol y el consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos, que han sido asociados al desarrollo de cáncer (23-25).

En México, en el año 2013, los tumores causaron 13.6% del total de defunciones de la población a partir de 20 años, correspondiendo el 93.6% a tumores malignos. Dentro de los tumores malignos, los de órganos digestivos fueron la primera causa de mortalidad entre esta población, con 32.52 casos por cada 100,000 habitantes. Los tumores de órganos respiratorios e intratorácicos ocuparon el segundo lugar con 10.58 defunciones por cada 100,000 habitantes; y el tercer lugar lo ocuparon los tumores del sistema reproductor masculino con 8.44 defunciones por cada 100,000 habitantes. A pesar de que el cáncer infantil es menos frecuente que el cáncer en los adultos, también representa una de las principales causas de morbimortalidad en menores de 20 años, siendo la leucemia linfoblástica aguda el tipo más común (26).

1.4. Cáncer colorrectal

En 1990, Fearon y Vogelstein generaron un modelo de carcinogénesis colorrectal al que se le denominó el modelo clásico (Fig. 1), el cual establece que el cáncer colorrectal se desarrolla como resultado de una transformación progresiva del epitelio colónico normal a una displasia denominada pólipo adenomatoso y posteriormente a un carcinoma invasivo. Se sabe que, en general, la progresión de estas etapas es lenta, ya que se requiere de años para llegar a manifestarse el cáncer como tal, y que la transformación se acompaña de cambios secuenciales en genes específicos: *APC*, *K-RAS*, *SMAD4* y *p53* (27,28).

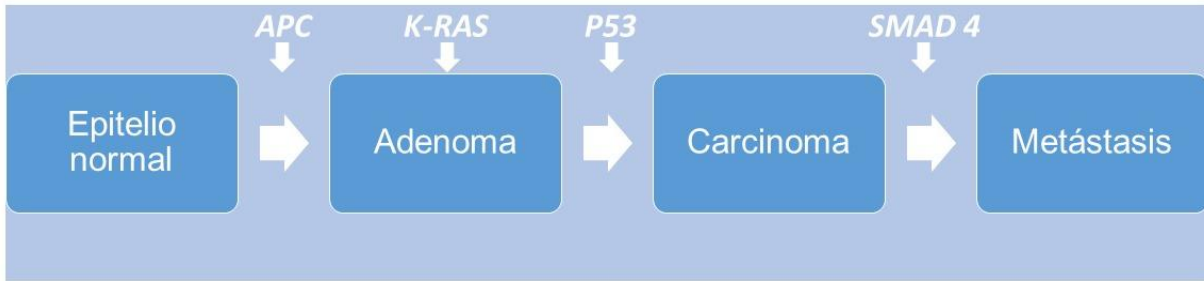


Figura 1. Modelo clásico de la carcinogénesis colorrectal.

La transformación progresiva del epitelio colónico normal al carcinoma se acompaña de cambios secuenciales sobre genes específicos. Adaptado de Volgestein (1990) y Tejpar (2002) (27,29).

De acuerdo con este modelo, un evento temprano en la carcinogénesis colorrectal es la inactivación del gen supresor tumoral *APC*, el cual es un regulador negativo de la vía de señalización Wnt. Las mutaciones en el gen *APC* conducen a la desestabilización del complejo de destrucción de la β -catenina, lo que provoca una acumulación de éste coactivador transcripcional, y como consecuencia una activación de los genes diana de esta vía, como *c-MYC*, un importante factor de transcripción de genes involucrados en la proliferación celular (30). Mutaciones somáticas en *APC* ocurren en alrededor del 80% de los casos de cáncer colorrectal esporádico, mientras que la mutación germinal es responsable de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), enfermedad autosómica dominante caracterizada por la presencia de una gran cantidad de pólipos adenomatosos en colon y recto, que si no son tratados desencadenan en el desarrollo del cáncer (31).

Por otro lado, la mutación que conduce a la desregulación del protooncogen *K-RAS* es también considerado un evento temprano en la formación del cáncer colorrectal. *K-RAS* tiene una importante participación en los procesos de señalización celular a través de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PIK3) (32).

La mutación del gen supresor tumoral *P53*, el cual tiene una importante participación en los procesos de apoptosis, también parece ser un acontecimiento tardío en la carcinogénesis colorrectal y se ha postulado que marca la transición de adenoma a carcinoma (27).

La pérdida de material genético en el brazo largo del cromosoma 18 (18q) se produce más tarde en la etapa de desarrollo de adenoma a carcinoma. Uno de los genes localizados en esta región es *SMAD4*, gen supresor tumoral que actúa en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (33).

Trabajos posteriores al de Fearon y Vogelstein han mostrado que la acumulación de cambios genéticos, y no su orden de aparición es la que dicta la transformación de las células normales a cancerosas, además de que son pocos los tumores que presentan todas las mutaciones consideradas en el modelo clásico (34).

El cáncer colorrectal es una enfermedad heterogénea, en la cual se han identificado tres fenotipos moleculares que representan diferentes formas de inestabilidad genética. El más prevalente en los casos de cáncer esporádico es el fenotipo de inestabilidad cromosómica, en el cual las células cancerosas se caracterizan por presentar alteraciones en el número de cromosomas (aneuploidías) y rearrreglos cromosómicos. Uno de los factores desencadenantes de los tumores que presentan este fenotipo, es la pérdida de un gen supresor tumoral como *APC* (35). El fenotipo de inestabilidad microsatelital se caracteriza por presentar una acumulación de alteraciones en secuencias cortas y repetidas de nucleótidos (microsatélites) en el DNA tumoral en comparación con el DNA normal, debido a alteraciones en los sistemas de reparación de errores. Los genes de reparación que con mayor frecuencia se asocian a este fenotipo son *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH2* y *hMSH6*. El CRC hereditario no polipósico (HNPCC) o síndrome de Lynch se caracteriza por una mutación germinal en alguno de estos genes, que conduce a la aparición temprana de tumores, predominantemente en el colon proximal, asociados a tumores en otros órganos como ovarios, tracto urinario o intestino delgado (36). Finalmente, el fenotipo de hipermetilación de islas CpG se caracteriza por la inactivación transcripcional de genes supresores tumorales debida a una hipermetilación del DNA en regiones promotoras ricas en citosina y guanina (37).

1.4.1. Epidemiología del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CRC) es el tercer tipo de cáncer más común en hombres (10% del total) y el segundo en mujeres (9.2%) a nivel mundial. Su incidencia varía de manera considerable dependiendo del nivel de desarrollo de cada región, presentándose más del 50% de los casos en regiones desarrolladas. La mayor incidencia se localiza en Australia y Nueva Zelanda, y la menor incidencia en África y Asia (20).

En México, el CRC es el cuarto más frecuente y representa el 2.68% de los tumores malignos. El CRC ha ido en aumento en los últimos años y representa el 3.8% de los nuevos casos de cáncer. Aproximadamente el 14% del total de los casos se presenta en menores de 50 años, sin embargo, a pesar de que se exhibe un patrón más agresivo en este grupo de edad, la supervivencia es mayor que la observada en los adultos mayores (38).

Los factores de riesgo para desarrollar CRC incluyen la edad, sexo, predisposición genética, dieta, peso y estilo de vida. Los hombres y los adultos mayores tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de colon que las mujeres y la población joven. Mientras que el sedentarismo y la obesidad también incrementan dicho riesgo (39).

Aproximadamente el 25% de los casos de CRC ocurre en individuos con antecedentes familiares, incluyendo FAP y HNPCC (40).

Pese al desarrollo de nuevos fármacos la supervivencia a cinco años en pacientes con CRC metastásico se estima en un 5-8% (41).

1.5. Tratamiento del cáncer colorrectal

El tratamiento de elección para el CRC es la cirugía, la cual puede ser abierta o laparoscópica y debe incluir la resección del tumor y de al menos 12 nodos linfáticos adyacentes. En el caso de tumores irresecables se utiliza radioterapia y quimioterapia con el objetivo de convertirlos en resecables y poder realizar la cirugía (42,43). El uso de diversos regímenes de radiación pre- y post- operatorios también

se efectúa como terapia de soporte para prevenir recurrencias locales. La radioterapia fraccionada estándar consiste en administrar pequeñas dosis durante 5 a 6 semanas, mientras que en la radioterapia de corta duración se administran dosis más elevadas durante 5 días (44,45).

Los tres medicamentos más utilizados en el tratamiento del cáncer colorrectal son fluorouracilo, irinotecan y oxaliplatino (46). El fluorouracilo es un antimetabolito que inhibe la replicación del DNA al bloquear la síntesis de timina, y ha sido el estándar a utilizar en el CRC durante más de 50 años. El irinotecan es una camptotecina (alcaloide) semisintética que inhibe a la topoisomerasa I y se utiliza para el tratamiento de pacientes con CRC refractario a fluorouracilo. El oxaliplatino es un agente alquilante que inhibe la replicación al formar aductos de DNA, y se utiliza en pacientes con cáncer refractario a irinotecan (43).

La quimioterapia de primera elección para el CRC metastásico es utilizar leucovorin (ácido folínico), fluorouracilo, y oxaliplatino o irinotecan (FOLFOX o FOLFIRI, respectivamente) (47). Generalmente cuando fracasan estos esquemas se recurre a fármacos de terapia dirigida que también se han aprobado para uso en pacientes con CRC metastásico como: bevacizumab, cetuximab, panitumumab, aflibercept y regorafenib (47,48).

Los fármacos de terapia dirigida se unen a un blanco específico que generalmente está sobre-expresado en el tumor. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibiendo así la unión de éste a sus receptores, con lo que se reduce la vascularización del tumor y, por tanto, se inhibe su crecimiento (49). El aflibercept es una proteína de fusión recombinante que también inhibe la angiogénesis bloqueando al VEGF-A, VEGF-B y al factor de crecimiento placentario (29). El regorafenib es un inhibidor multikinasa que inhibe proteínas de señalización clave implicadas en la oncogénesis, tales como BRAF y RAF1, así como cinasas del estroma que soportan el microambiente del tumor y receptores de tirosina cinasas implicadas en la angiogénesis (50). El cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimera humano/ratón (IgG1) y el panitumumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG2), que se

unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), impidiendo su activación y boqueando así su vía de señalización, la cual regula la proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, migración y apoptosis (46).

A pesar del desarrollo de nuevos fármacos en los últimos años, el fracaso terapéutico es elevado, ya en que más del 90% de los pacientes con CRC metastásico se desarrollan resistencias, por lo que se están buscando esquemas de tratamientos más efectivos (51). Un grupo de moléculas que ha mostrado actividad anticancerosa y cuya eficacia en combinación con la terapia convencional se ha demostrado, son los modificadores epigenéticos. Dentro de ellos, se encuentran los inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC) y los inhibidores de las DNA metil transferasas (DNMT). Un representante de este grupo de moléculas es el vorinostat, el cual fue aprobado para su uso en el linfoma cutáneo de células T y cuya eficacia en combinación con fluorouracilo y leucovorin está siendo evaluada para tratar CRC resistente a estos últimos. El vorinostat incrementa la acetilación de proteínas histonas y no histonas al inhibir el sitio catalítico de las HDAC, lo que modifica la expresión de múltiples genes relacionados con procesos como la proliferación celular y apoptosis (52). También se está evaluando el uso de RRx-001, un modulador epigenético que ha demostrado actividad tanto hacia las HDAC, como hacia las DNMT, para resensibilizar a las células tumorales que han generado resistencia al tratamiento con irinotecan, y se han visto resultados prometedores (53).

Además de la quimioterapia, actualmente se manejan esquemas de quimioprevención en el CRC, que se aplican tanto en pacientes con alto riesgo de desarrollar CRC, ya sea por tener antecedentes familiares o por presentar pólipos colorrectales, como en pacientes a los cuales se les realizó la extirpación del tumor, para prevenir las recurrencias. Estos esquemas incluyen el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina y el celecoxib, y el uso de micronutrientes y antioxidantes como ácido fólico, calcio, selenio, beta carotenos y vitaminas D, A, C y E. Adicionalmente se hace la recomendación a los pacientes de mantener un estilo de vida saludable, con una baja ingesta de alcohol, una dieta baja

en grasa y rica en fibra, así como la actividad física constante, ya que se ha demostrado que estos factores disminuyen el riesgo de padecer CRC (28,54).

1.6. Mecanismos de muerte celular y su implicación en el cáncer

Se han establecido diferentes mecanismos de muerte celular de acuerdo con las características morfológicas y bioquímicas que presentan (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los diferentes mecanismos de muerte celular

Mecanismo de muerte celular	Características morfológicas	Características bioquímicas
Apoptosis	Condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, formación de pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto, contracción celular y desprendimiento de cuerpos apoptóticos ^(55,56)	Muerte programada, se lleva a cabo a través de una serie de eventos altamente regulados, requiere de ATP, implica síntesis proteica, presenta fragmentación internucleosomal del DNA (cada 200 pb), no induce respuesta inflamatoria ⁽⁵⁵⁾
Necrosis	Hinchazón de los organelos y de la célula, daño mitocondrial, formación de vacuolas, lisis celular y liberación del contenido al medio extracelular ⁽⁵⁷⁾	Muerte accidental, proceso no controlado (caótico), catástrofe bioenergética por agotamiento del ATP, no implica síntesis proteica, induce respuesta inflamatoria ⁽⁵⁷⁾
Autofagia	Formación de vesículas de doble membrana que encapsulan a los organelos (autofagosomas), membrana nuclear y celular intactas, no se observa condensación de la cromatina ⁽⁵⁷⁾	Muerte programada, proceso controlado, induce la producción de energía a través de la degradación de componentes intracelulares, induce respuesta inflamatoria ⁽⁵⁸⁾

1.6.1. Apoptosis

La apoptosis es una clase de muerte celular programada que contribuye al mantenimiento de la homeóstasis tisular, en la cual participan un grupo importante de enzimas proteolíticas denominadas caspasas (cisteinil-aspartato proteasas) que se expresan como zimógenos inactivos y se activan por proteólisis (59).

La activación de este mecanismo de suicidio celular puede darse por factores tanto extrínsecos como intrínsecos (Fig. 2). La vía extrínseca se activa por el acoplamiento de receptores transmembranales denominados receptores de muerte (CD95/APO-1/Fas, TNF, TRAIL) a sus ligandos. Tras dicha unión, los dominios intracelulares de los receptores atraen moléculas adaptadoras como el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), que en conjunto con la procaspasa 8 forman el complejo de señales inductoras de muerte (DISC) que conduce a la activación de la caspasa iniciadora 8, la cual a su vez activa otras caspasas efectoras de la apoptosis (57).

La vía intrínseca, también denominada mitocondrial, es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como daño al DNA o ausencia de factores de crecimiento. Con la participación de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 como Bax y Bak, se incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, con lo cual diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de estas proteínas son el citocromo c, SMAC/DIABLO (Segundo Activador de Caspasas Derivado de la Mitocondria/ Proteína Directa de Unión a IAP con bajo pI), AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) y Omi/HTRA2 (proteína A2 requerida para las altas temperaturas). Cuando el citocromo c es liberado, se une y activa a Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa apoptótica) en el citoplasma, lo que promueve que este último se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma. El apoptosoma media la activación autocatalítica de la caspasa iniciadora 9, y esta a su vez activa a la principal caspasa efectora, caspasa

3. Por su parte, SMAC/DIABLO y Omi/HTRA2 contribuyen al proceso apoptótico al antagonizar a las IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis) (14).

La vía mitocondrial está regulada por la familia de las proteínas Bcl-2. Estas proteínas controlan la permeabilidad de la membrana mitocondrial, e incluyen proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W y Bcl-B; y proteínas proapoptóticas: Bax, Bak, Bok y Bid. Cuando las proteínas proapoptóticas como Bax y Bak se activan, y se oligomerizan en la membrana mitocondrial, forman canales a través de los cuales se liberan las moléculas proapoptogénicas como el citocromo c. Mientras que el papel de las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 es bloquear la liberación de dichas moléculas, con el objetivo de preservar la viabilidad celular (60,61).

Generalmente ambas rutas convergen en la activación de las caspasas efectoras, siendo la principal la caspasa 3. Sin embargo, también puede llevarse a cabo la activación de Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) mediada por la caspasa 8, que conduce a la activación de la vía mitocondrial a través de la liberación de citocromo c (14).

Se ha demostrado que algunos factores que son liberados de la mitocondria como AIF y Endo G pueden inducir un proceso apoptótico sin que su actividad se vea afectada por la presencia de inhibidores de caspasas o por la ausencia de citocromo c (Fig. 2). Estas proteínas al ser liberadas de la mitocondria se traslocan al núcleo e inducen la fragmentación del DNA. Una característica de AIF es que su actividad origina fragmentos de DNA de alto peso molecular (~50 kb). Este factor es considerado el principal regulador de la apoptosis independiente de caspasas. AIF puede ser liberado en ausencia de caspasas y de manera independiente a Bax y Bak, con la participación de PARP-1 (poli (ADP-ribosa) polimerasa 1), una enzima nuclear que participa en la respuesta ante daño al DNA, y que puede ser activada por diversos agentes, incluyendo especies reactivas de nitrógeno y oxígeno. La activación excesiva de PARP-1 origina una muerte celular intrínseca derivada de la activación de AIF (62,63).

Durante la transformación oncogénica, las células neoplásicas se vuelven resistentes a la apoptosis como resultado de las alteraciones genéticas y epigenéticas que han sufrido, las cuales favorecen un ambiente antiapoptótico (incremento en la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-XL o IAPs, y disminución en proteínas proapoptóticas como Bax o Apaf-1). La desregulación de la apoptosis impulsa la aparición de otros eventos oncogénicos, tales como la prolongación del tiempo de vida celular, la acumulación de mutaciones y el crecimiento en condiciones de estrés; así como también contribuye a la resistencia terapéutica, ya que la mayoría de las terapias, incluyendo radiación y quimioterapia, van encaminadas a incrementar la apoptosis (64).

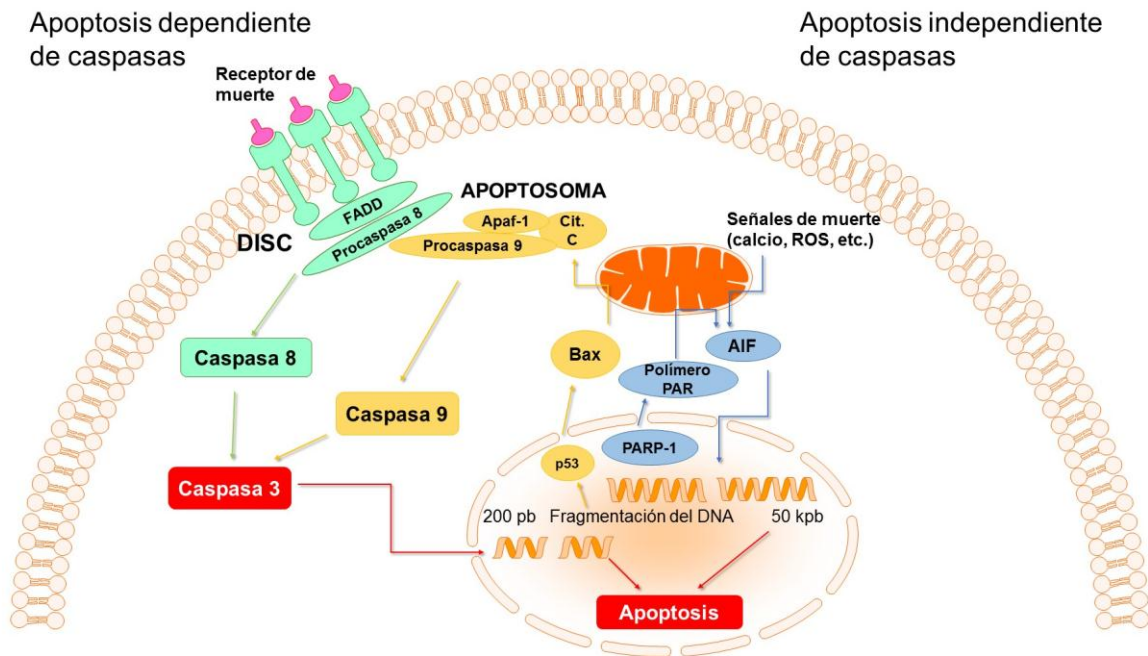


Figura 2. Activación de las vías de apoptosis.

La activación de las vías dependientes de caspasas se puede dar por medio de factores extrínsecos e intrínsecos. La primera, por unión de receptores de muerte a sus ligandos y la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) para dar lugar a la activación de la caspasa iniciadora 8; y la segunda por factores como daño al DNA que induce la producción de proteínas proapoptóticas como Bax, la liberación de moléculas proapoptogénicas de la mitocondria como el citocromo c (Cit c) y la formación del apoptosoma, para dar lugar a la activación de la caspasa iniciadora 9. Ambas rutas convergen en la activación de caspasas efectoras como la caspasa 3. La activación de apoptosis independiente de caspasas se da por medio de diversos factores que afectan la permeabilidad de la membrana mitocondrial como el incremento de calcio intracelular, o por una activación de poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1), que producen la liberación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF), el

cual se trasloca al núcleo e induce la degradación del DNA en fragmentos largos (50 kb), a diferencia de la apoptosis dependiente de caspasas que origina fragmentos cortos (200 b). Adaptado de Cregan (2004) y Millan (2009) (62,63).

1.6.2. Necrosis

La necrosis es la muerte celular no programada, derivada de una catástrofe bioenergética, resultante de agotamiento de ATP a un nivel incompatible con la supervivencia celular. Es desencadenada por accidentes celulares tales como insultos tóxicos o daños físicos y se caracteriza morfológicamente por una vacuolización del citoplasma, la ruptura de la membrana plasmática e inducción de inflamación alrededor de la célula necrótica, atribuible a la liberación del contenido celular (55).

Al considerarse como una forma patológica de muerte celular, se pensaba que la necrosis era un proceso no regulado; sin embargo, se ha demostrado que existen diversos tipos de necrosis regulada. Un tipo de necrosis programada, la necroptosis, es iniciada en respuesta a ciertos estímulos como la activación de receptores de muerte o receptores tipo Toll por unión a sus ligandos. No obstante, este tipo de muerte celular solo se hace evidente y juega un papel importante en la eliminación de células con daño al DNA cuando los mecanismos de apoptosis se encuentran comprometidos (56).

En relación con el cáncer, se ha determinado que la necrosis al ser una muerte celular inmunogénica puede contribuir tanto a la tumorigénesis, como a la respuesta antitumoral. Por un lado, puede promover la instauración del ambiente inflamatorio crónico que rodea a los tumores favoreciendo su desarrollo, y por otro lado la liberación de algunas moléculas asociadas a la necrosis, como HMGB1 (proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1), capaces de promover una respuesta inmune antitumoral. El potencial de HMGB1 como coadyuvante en la terapia contra el cáncer está siendo evaluada (58,65,66).

1.6.3. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico que implica la degradación de componentes citoplasmáticos, agregados de proteínas y organelos, a través de la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas (autofagolisosomas) para que su contenido sea degradado y pueda ser reciclado. Este proceso tiene múltiples funciones fisiológicas; sirve para eliminar organelos dañados o agregados proteicos que pueden causar daño a la célula y reciclarlos, y le permite a la célula adaptarse a condiciones de estrés como la hipoxia o la falta de nutrientes sirviendo como una fuente interna de energía. El resultado final de una célula con elevados niveles de autofagia puede ser tanto la sobrevivencia como la muerte (67).

La autofagia se encuentra regulada por una gran cantidad de genes denominados ATG (genes relacionados con la autofagia). Existe una estrecha vinculación entre la autofagia y la apoptosis, de manera que la inhibición de la primera favorece la segunda y viceversa. Entre las proteínas que participan en la regulación tanto de la apoptosis como de la autofagia se encuentran Atg5 y p53. Estos factores pueden activar o reprimir la autofagia dependiendo del estatus energético y de las vías de señalización activadas (57).

En etapas tempranas del desarrollo tumoral la autofagia puede actuar como un supresor gracias a la expresión del inductor de autofagia beclin-1, mientras que en etapas avanzadas promueve la progresión tumoral, ya que las células que se localizan en el centro de los tumores utilizan este mecanismo para soportar las condiciones de poco oxígeno y nutrientes. Adicionalmente, la autofagia puede ser inducida en células de cáncer como un mecanismo de adaptación que les confiere resistencia a la quimioterapia y la radioterapia. En estos casos, el uso de agentes que inhiben la autofagia y consecuentemente re-sensibilizan a las células hacia la apoptosis, en combinación con agentes inductores de apoptosis, es una estrategia terapéutica que está en evaluación. Por otro lado, la autofagia contribuye a la muerte celular cuando se presentan defectos en la apoptosis y en estos casos las moléculas inductoras de autofagia cobran relevancia (57,68).

1.7. Ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) son ácidos orgánicos débiles (pKa~4.8) constituidos por un grupo carboxilo y una cadena de uno a seis átomos de carbono saturados. Son el principal producto de la fermentación anaerobia del almidón, fibra dietética (celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas, etc.) y otros oligosacáridos poco digeribles, por las bacterias residentes del colón de los mamíferos. Los tres principales SCFA producidos son acetato, propionato y butirato en una proporción 60:25:15, respectivamente. La cantidad de SCFA producidos depende de las especies que conforman la microbiota, del tipo de sustratos a ser fermentados y de la velocidad del tránsito intestinal, pero se mantiene en el rango de 70 a 130 mM (69,70). Estos compuestos tienen funciones tanto nutricionales, como regulatorias e inmunomoduladoras. Mientras que el butirato es la principal fuente de energía para los colonocitos, el propionato es en gran parte metabolizado por el hígado, mientras que el acetato lo es por los tejidos periféricos (71,72).

A través de su reconocimiento por los receptores acoplados a proteínas G (GPR41 y GPR43) los SCFA pueden actuar como moléculas de señalización, tanto en el epitelio intestinal, como a nivel sistémico. Participan en la regulación de la ingesta de alimento y la resistencia a la insulina, actúan reforzando la barrera de defensa contra la colonización de patógenos al estimular la producción de péptidos antimicrobianos, y ejercen actividad antiinflamatoria ya que pueden inhibir la producción de eicosanoides y citocinas proinflamatorias (72-75).

1.8. Butirato y cáncer de colon

El butirato puede actuar tanto en la prevención del cáncer de colon, como en la inhibición de su desarrollo. Este SCFA modula la proliferación, diferenciación celular y apoptosis de las células de epitelio colónico, manteniendo así la homeóstasis en el tejido (76).

El butirato puede desencadenar diferentes procesos dependiendo de su concentración, la cual varía en cada una de las regiones del colon, siendo mayor en

el colon proximal y menor en el distal; y más elevada en la región luminal que en la base de las criptas (77).

Dentro de las propiedades profilácticas del butirato contra la carcinogénesis colorrectal se ha demostrado que contribuye a la eliminación de carcinógenos de la dieta a través de la inducción de enzimas que inactivan xenobióticos y agentes oxidantes (como la glutatión S-transferasa), y ejerce actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) y la inducción del factor proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ), disminuyendo la exacerbación de la carcinogénesis inducida por la inflamación (78-80).

Otra de las características que presenta el butirato es que en los colonocitos normales induce proliferación, mientras que en las células transformadas induce apoptosis; fenómeno conocido como la paradoja del butirato. Esto se debe a que en las células normales el butirato es utilizado como fuente de energía a través de la β -oxidación, y como fuente de acetil coenzima A que sirve de cofactor para proteínas histonas acetil transferasas y de esta manera regula primordialmente genes relacionados con la proliferación celular. Mientras que en las células cancerosas el butirato no es utilizado como fuente de energía debido al efecto Warburg, sino que se acumula en el núcleo e inhibe a las proteínas histonas desacetilasas (HDAC), incrementándose con ello la acetilación de las histonas y la conformación estructural de los nucleosomas, regulando así la transcripción de gran cantidad de genes relacionados con el control del ciclo celular y la apoptosis (81).

Para que se lleve a cabo todo este proceso de regulación, es fundamental el transporte del butirato al interior de los colonocitos. Sin embargo, se ha visto que durante la transición de células normales a células cancerosas, la expresión de los transportadores de butirato, MCT1 (transportador de monocarboxilato 1), y SMCT1 (transportador de monocarboxilato acoplado a sodio 1), se encuentra disminuida, por lo que la cantidad de butirato en el interior de las células es insuficiente para inducir una adecuada regulación (82).

Por otro lado, un bajo consumo de fibra implica una producción pobre de butirato en el intestino, que de igual manera es insuficiente para controlar el desarrollo de las células cancerosas. Varios estudios han demostrado que el bajo consumo de fibra se asocia a una mayor incidencia de cáncer colorrectal (83-85).

Se ha observado una producción disminuida de butirato en pacientes con pólipos adenomatosos (neoplasias que generalmente anteceden a la aparición del tumor) y con cáncer colorrectal que, en voluntarios sanos, lo cual correlaciona con la disminución de bacterias productoras de butirato *Clostridium coccooides*, *Roseburia* spp. y *Eubacterium* spp. en la microbiota colónica de pacientes con cáncer colorrectal, en comparación con la microbiota de pacientes sanos (86,87). Este desbalance en la microbiota colónica, a la vez que se traduce en una producción disminuida de butirato, permite la instauración de microorganismos oportunistas que inducen procesos inflamatorios e incrementan la producción de toxinas mutágenas contribuyendo así al desarrollo de la carcinogénesis (88).

Los niveles fisiológicos adecuados de butirato han demostrado tener un efecto citotóxico selectivo hacia células cancerosas. El efecto del butirato ha sido estudiado tanto en modelos *in vitro*, como en modelos *in vivo* y se ha demostrado que puede inducir apoptosis tanto por vía intrínseca como por vía extrínseca, induciendo la síntesis o activación de proteínas proapoptóticas como Bax, e inhibiendo proteínas antiapoptóticas como Bcl-2; además puede inhibir la proliferación o detener a las células cancerosas en las fases G1 o G2 del ciclo celular incrementando la expresión de p27, p21 (por vía tanto independiente como dependiente de p53), así como de ciclinas (como la ciclina D1) y cinasas dependientes de ciclinas (Fig. 3) (81,89-92).

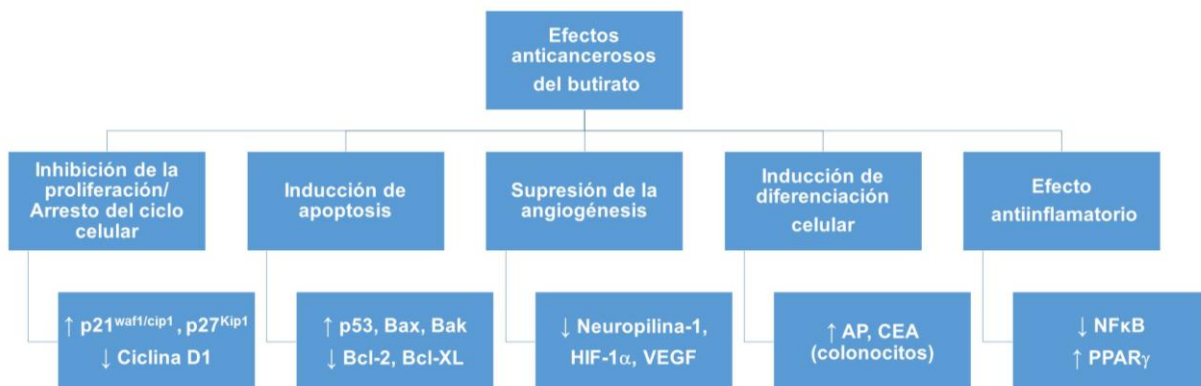


Figura 3. Efectos anticancerosos del butirato.

La actividad del butirato sobre células cancerosas se da por medio de diversos mecanismos que incluyen cambios en la expresión de reguladores del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, diferenciación celular e inflamación. HIF-1 α (Factor inducible por hipoxia-1 α), VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), AP (Fosfatasa alcalina), CEA (Antígeno carcinoembrionario), NF κ B (Factor nuclear κ B), PPAR γ (Factor proliferador de peroxisomas gamma) (76,93).

1.9. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son pequeños péptidos de entre 12 a 100 aminoácidos, en su mayoría catiónicos, con cargas de +2 a +7, que forman parte del sistema de defensa de los organismos que los producen. Estas moléculas han sido conservadas durante la evolución, ya que son producidas tanto en arqueas como en bacterias y eucariotas (94,95).

Su principal función es proteger al huésped contra un amplio espectro de microorganismos que incluyen bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, virus encapsulados y protozoarios (96). Para ello, pueden actuar a través de diversos mecanismos, dentro de los cuales el más reconocido es la ruptura celular membranolítica, la cual se fundamenta en el hecho de que su naturaleza catiónica les permite interactuar, a través de fuerzas electrostáticas, con elementos aniónicos presentes en la membrana o pared celular del microorganismo diana y de esta manera desestabilizarla para conducir a la lisis celular (97). Otros de los mecanismos que se han estudiado involucran blancos intracelulares e incluyen la inhibición de la síntesis de DNA y proteínas, la inhibición del plegado de proteínas asistida por

chaperonas, la inhibición de actividades enzimáticas y de la síntesis de la pared celular (98).

Los AMP producidos por bacterias, insectos, plantas y vertebrados, han sido extensamente estudiados y se ha creado una base de datos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), en la que se encuentran registrados alrededor de 2800 AMP de diversas fuentes (99).

Conjuntamente con su actividad directa sobre los microorganismos, los AMP contribuyen a la defensa del huésped actuando como moléculas inmunomoduladoras. Participan en la regulación de la respuesta pro y antiinflamatoria, en el reclutamiento de células inmunológicas, como neutrófilos y monocitos, en la maduración de células dendríticas y en la diferenciación de macrófagos, así como en la regulación de la apoptosis (100).

1.9.1. Péptidos antimicrobianos de plantas

Los AMP juegan un papel fundamental en la defensa de las plantas contra patógenos, principalmente hongos y bacterias. Aproximadamente el 3% de los genes de plantas codifican para este tipo de péptidos, lo que origina una gran diversidad entre ellos. Los AMP de plantas se caracterizan por ser ricos en cisteínas, que contribuyen a estabilizar su estructura a través de la formación de enlaces disulfuro. De acuerdo a su secuencia de aminoácidos, su estructura terciaria y los motivos de cisteína que determinan los patrones de los enlaces disulfuro, los AMP de plantas han sido clasificados en diversas familias, siendo una de las más importantes la familia de las defensinas (101,102).

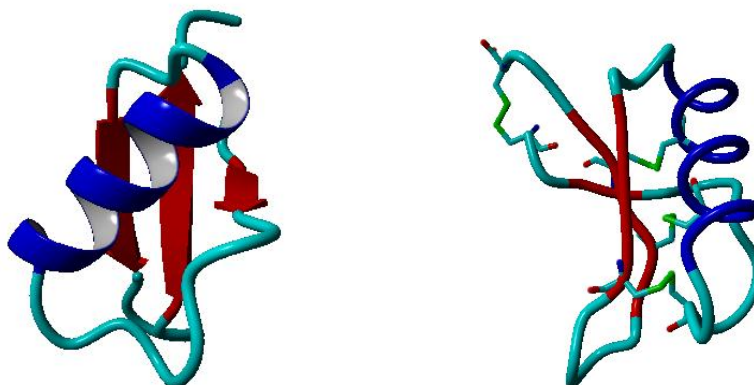


Figura 4. Estructura tridimensional de las defensinas de plantas.

Las defensinas de plantas están conformadas por tres hojas β antiparalelas y una hélice α (izquierda) y contienen cisteínas conservadas que forman de tres a cuatro puentes disulfuro (derecha). Las hojas β se muestran en rojo, la hélice α en azul y los puentes disulfuro en verde. Imágenes de la defensina γ -tionina de chile habanero creadas en el software YASARA.

Las defensinas se encuentran en diversos tejidos de las plantas, como tubérculos, hojas, vainas, flores y tallos, pero la mayoría se han identificado en semillas y raíces. Se caracterizan por tener residuos conservados de cisteínas que forman de tres a cuatro puentes disulfuro. Su estructura tridimensional está conformada por tres hojas β antiparalelas y una hélice α en configuración $\beta\alpha\beta\beta$ (Fig. 4). La hélice α contiene un segmento Cis-X-X-X-Cis que está conectado al segmento Cis-X-Cis de la tercera lámina por medio de dos enlaces disulfuro, motivo conocido como hélice α estabilizada por cistina ($CS\alpha/\beta$). Adicionalmente, tienen dos motivos conservados; el núcleo α que comprende el giro que conecta la primera lámina β a la hélice α , y el núcleo γ , la horquilla que une la segunda lámina β a la tercera ($L\beta_2\beta_3$) (101,103,104).

1.9.2. Péptidos antimicrobianos con actividad anticancerosa

Los AMP tanto de origen humano, como de origen no humano (plantas, bacterias, animales) son considerados una alternativa atractiva en la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento del cáncer debido a que existen numerosos estudios que demuestran su actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas,

incluso sobre aquellas que han desarrollado resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos (105).

Los mecanismos por los cuales los AMP matan a las células cancerosas no han sido completamente dilucidados, pero se propone que está involucrada tanto su actividad membranolítica, como su efecto sobre otros blancos celulares (106).

Una de las ventajas que ofrecen los AMP frente a los tratamientos utilizados actualmente en la terapia contra el cáncer, es su selectividad hacia las células transformadas, lo cual se debe a ciertas diferencias en algunas características de las membranas de las células cancerosas en comparación de las células sanas. Mientras que las células sanas presentan gran cantidad de moléculas zwitteriónicas como fosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidiletanolamina en el exterior, que les confieren una carga neutra, las células transformadas son ricas en moléculas aniónicas como la fosfatidilserina (representando más del 9% del total de fosfolípidos), mucinas O-glicosiladas y sulfato de heparina, que les confieren una carga predominantemente negativa que les permite interactuar con mayor afinidad con los AMP catiónicos. Adicionalmente, el incremento en el tamaño de la superficie de las membranas de las células cancerosas, debido a la abundante presencia de microvellosidades, así como el incremento en su permeabilidad, las hacen más susceptibles a la desestabilización provocada por los AMP (105,107).

Varios modelos han sido desarrollados para explicar la interacción entre los AMP y las membranas celulares, que dan lugar a la muerte celular (Fig. 5).

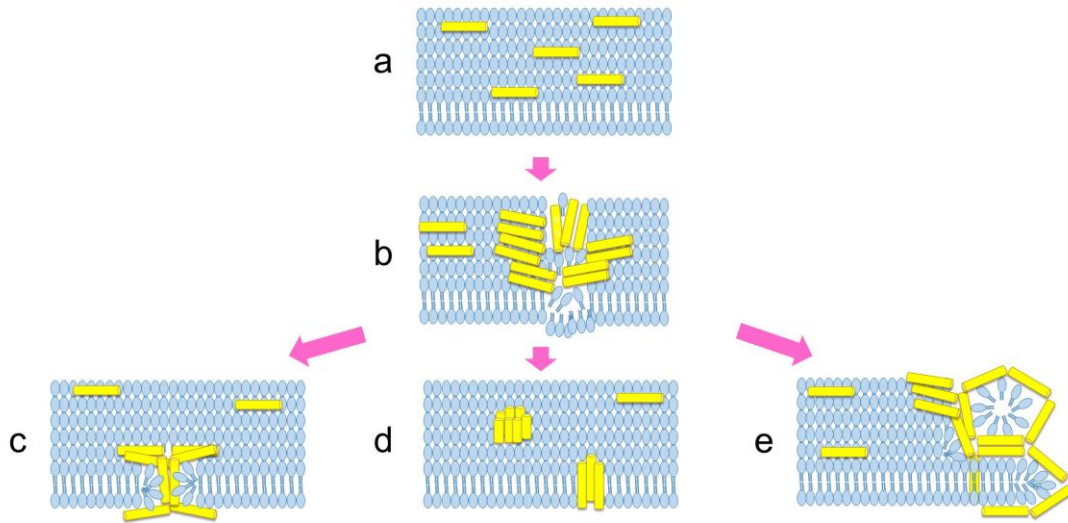


Figura 5. Modelos de desestabilización de la membrana plasmática por interacción con los AMP.

Los AMP cargados positivamente se unen a las células cancerosas a través de interacciones electrostáticas con componentes de la membrana cargados negativamente y en un principio se alinean de modo planar (a). En el modelo de tapiz (b), concentraciones crecientes de péptido cubren la superficie de la célula y al llegar a una concentración crítica, causan una curvatura que conduce a la desestabilización. En una extensión del modelo de tapiz conocido como el modelo poro toroidal (c), el estrés causado por la curvatura permite que los AMP, que son lo suficientemente largos para atravesar la membrana celular, formen poros toroidales transitorios. Los AMP se orientan de tal manera que la cara hidrófila forma el canal interior, mientras que la cara hidrofóbica está en el exterior, durante este proceso. En el modelo de duela de barril (d) las hélices α anfipáticas de los péptidos, que son de longitud suficiente para abarcar el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica de la membrana, se insertan formando agregados que dan lugar a la formación de poros transmembranales transitorios. El modelo tipo detergente (e) propone que los AMP se intercalan entre las cabezas de fosfolípidos de manera dependiente de la concentración, causando una curvatura y la formación de micelas en regiones de alta densidad de péptido. Adaptado de Mader (2006) y Hoskin (2008) (107,108).

El modelo “tapiz” se propone como la interacción inicial, en la cual los AMP permanecen asociados con la cara externa de la membrana, acumulándose hasta formar una especie de tapiz capaz de debilitar la membrana y causar su colapso ya sea formando poros o micelas (por medio de los modelos descritos a continuación). En el modelo “duela de barril”, luego de interactuar con la membrana y alcanzar un nivel crítico entre péptido y lípido, las hélices anfipáticas se agrupan y agregan formando poros transmembranales con los residuos hidrofílicos orientados hacia la luz del poro, mientras que las superficies hidrofóbicas interaccionan con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos formando un canal acuoso que genera una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana. En el modelo de “poro

toroidal”, los péptidos se agregan sobre la superficie de la membrana llevando a que ésta se doble y a continuación los péptidos se insertan formando un canal mixto entre el péptido y los lípidos de la membrana. Finalmente, en el modelo “tipo detergente” la agregación del péptido en la superficie de la membrana, cuando alcanza una concentración suficientemente alta, logra romperla en pequeños fragmentos micelares (107,108).

Dentro de los AMP con actividad membranolítica, está la tionina del muérdago (*Pyrularia pubera*), que ha mostrado actividad citotóxica contra células cancerosas, mostrando el inconveniente de que también provoca lisis en eritrocitos. Su mecanismo de acción involucra despolarización de la membrana, apertura de canales de calcio y activación de la fosfolipasa A2 (109). Otro ejemplo son las cecropinas, una familia de AMP de insectos identificados por primera vez en la hemolinfa del gusano de seda *Hyalophora cecropia*. Miembros de esta familia han mostrado actividad antitumoral frente a una gran diversidad de líneas celulares tanto de tumores sólidos, como de leucemias, induciendo la formación de poros. Las cecropinas A y B, mostraron efecto citotóxico y antiproliferativo sobre cuatro líneas celulares de cáncer de vejiga, sin afectar fibroblastos normales (110).

Además de interactuar con las membranas, algunos péptidos se internalizan en la célula por mecanismos poco conocidos aún. Una de las propuestas es que utilizan su capacidad de inducir la formación de poros solo para atravesar la membrana y una vez adentro, atacan blancos intracelulares, provocando la muerte celular por mecanismos diferentes a la lisis. Dentro de los mecanismos no membranolíticos se encuentran: la supresión de la angiogénesis tumoral, la inducción de apoptosis o necrosis, la estimulación del sistema inmune y la inhibición de la actividad de las proteasas y cinasas involucradas en la actividad oncogénica (97,111).

La LfcinB es un AMP bovino que induce muerte celular en diversas líneas celulares de cáncer de mama, colon, ovario y leucemia, sin afectar linfocitos normales, fibroblastos, ni células endoteliales. Su mecanismo fue estudiado en células de leucemia Jurkat, donde se encontró que induce apoptosis a través de la

producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), desestabilización del potencial de membrana mitocondrial y activación de las caspasas 9 y 3 (112). Al estudiar este péptido en modelos *in vivo*, se encontró que la administración subcutánea de LfcinB inhibe la metástasis hepática y pulmonar producida por células B16-B16 de melanoma y la metástasis pulmonar producida por células L5178Y-ML25 de linfoma, en un modelo experimental de metástasis en ratones singénicos. También se observó una inhibición en la cantidad de vasos sanguíneos asociados al tumor (actividad antiangiogénica) y supresión del crecimiento tumoral (113).

La ligatoxina B es una tionina del muérdago *Phoradendron liga* que inhibe el crecimiento de células U937GTB de linfoma y ACHN de adenocarcinoma renal multiresistente. Tiene la capacidad de formar poros en las membranas, pero se propone que también puede causar daño directo al DNA y de este modo inducir apoptosis, ya que se identificó en su estructura un dominio de unión a DNA (114).

El péptido FK-16, un fragmento correspondiente a los aminoácidos 17-32 de la catelicidina humana LL-37, presenta actividad citotóxica contra células de cáncer de colon LoVo y HCT116, superior al péptido original. Este péptido induce la muerte celular a través de apoptosis dependiente de AIF/Endo G (independiente de caspasas) y autofagia vía p53-Bax/Bcl-2 (115).

Además de la capacidad de algunos péptidos antimicrobianos de atacar directamente tanto a microorganismos, como a las células cancerosas, se ha visto que tienen la capacidad de regular la respuesta inmune innata, por lo que se ha estudiado su papel en la inmunidad antitumoral. Los AMPs pueden regular la inflamación al inducir la producción de quimiocinas y citocinas tanto proinflamatorias, como antiinflamatorias y, por lo tanto, podrían ser utilizados en la regulación del ambiente inflamatorio presente en el sitio del tumor. Además, se ha visto que los AMP pueden ayudar al sistema inmune en el reconocimiento y destrucción de las células tumorales, a través de la activación y reclutamiento de diversos tipos de células inmunológicas (116,117).

A este respecto, se ha demostrado que la catelicidina LL-37 puede inducir la producción de IL-8 de manera dependiente de la concentración (20-100 $\mu\text{g/ml}$) en la línea celular epitelial humana A549 (118). Además, el Aloferon-1, un péptido sintético derivado de un AMP de la mosca *Calliphora vicina*, ha mostrado actividad anticancerosa al estimular la producción de interferón (IFN) e incrementar la actividad de las células asesinas naturales (NK). En un modelo murino se observó que al aplicar este péptido en combinación con un régimen de agentes quimioterapéuticos convencionales (ciclofosfamida, doxorubicina y vincristina) se retardaba o suprimía por completo la aparición del tumor. Los resultados del tratamiento combinado mostraron ser superiores al de los tratamientos por separado (119). Otro ejemplo es la β -defensina 2 murina (BD2), la cual actúa sobre células dendríticas como quimioatrayente, además de que promueve su maduración, con lo que se activa la respuesta inmune mediada por células T. Se ha demostrado que la vacunación con células irradiadas que expresan BD2 inhibe el desarrollo y progresión de melanoma en ratones, a través de la activación de células NK, del incremento en la producción de IFN- γ e IL-12, y de la infiltración en el tumor de células T CD4⁺, T CD8⁺, macrófagos y células NK (116).

1.9.3. Defensinas de plantas con actividad anticancerosa

La actividad anticancerosa, los mecanismos de acción, la selectividad y la eficacia de los AMP ha sido particularmente estudiada en péptidos de origen animal. Sin embargo, existe una gran variedad de péptidos de origen vegetal, y es relativamente poca la información que existe acerca de su actividad. Dentro de las familias de AMP de plantas, se ha demostrado que las defensinas, tioninas y los ciclótidos presentan actividad anticancerosa (106).

Particularmente, se ha demostrado que las defensinas de plantas pueden inducir lisis celular (muerte necrótica) al interactuar con componentes específicos de la membrana plasmática o pueden inducir apoptosis tanto por vía intrínseca, como extrínseca (Tabla 2).

Tabla 2. Defensinas de plantas con actividad anticancerosa

Defensina	Fuente	Actividad anticancerosa contra	Selectividad	Modo de acción
Coccinina ⁽¹²⁰⁾	<i>Phaseolus coccineus</i> cv. "Mayor"	Líneas celulares HL60 y L1210	Selectiva, no afecta la proliferación de esplenocitos de ratón	No determinado
Faseococcina ⁽¹²¹⁾	<i>Phaseolus coccineus</i> cv. "Menor"	Líneas celulares HL60 y L1210	Selectiva, no afecta la proliferación de esplenocitos de ratón	No determinado
Defensina de frijol trepador morado ⁽¹²²⁾	<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. "Frijol trepador morado extra largo"	Líneas celulares HepG2, MCF-7, HT-29 y SiHa	Selectiva, no afecta eritrocitos ni células humanas embrionarias de hígado WRL68	No determinado
NaD1 ⁽¹²³⁾	<i>Nicotiana glauca</i>	Líneas celulares U937, HCT116, MCF-7, MM170, B16-F1 y Hela	No selectiva, afecta células humanas normales de músculo liso CASMC, endoteliales HUVEC y fibroblastos AHDF	Lisis celular
TTP3 ⁽¹²⁴⁾	<i>Solanum lycopersicum</i>	Línea celular U937	No determinada	Lisis celular
PaDef ⁽¹²⁵⁾	<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	Línea celular MCF-7	Selectiva, no afecta de células mononucleares de sangre periférica humana	Apoptosis vía intrínseca
γ-Tionina ⁽¹²⁶⁾	<i>Capsicum chinense</i>	Línea celular MCF-7	Selectiva, no afecta células de epitelio mamario bovino ni células mononucleares de sangre periférica humana	Apoptosis tanto por vía intrínseca como extrínseca

2. ANTECEDENTES

Se han empleado diversas estrategias con el objetivo de hacer los tratamientos contra el cáncer más efectivos y menos tóxicos hacia las células sanas. Dentro de estas estrategias se encuentra el uso de moléculas con novedosos mecanismos de acción, como la regulación epigenética, en combinación con la radioterapia y la quimioterapia convencional (127,128).

Dentro de las moléculas que inducen cambios epigenéticos se encuentra el butirato, un inhibidor de HDAC que tiene actividad citotóxica selectiva contra células cancerosas. La actividad del butirato y algunos derivados como el fenilbutirato, fueron evaluados inicialmente en cáncer de origen hematológico, tanto en modelos *in vitro*, como en pacientes. Sin embargo, debido a que son moléculas que se metabolizan rápidamente, en los ensayos clínicos no se lograron alcanzar los niveles plasmáticos requeridos para inducir un efecto citotóxico, pero sí suficientes para inducir una regulación epigenética. Por ello, comenzaron a realizarse estudios para probar su actividad en combinación con otras moléculas citotóxicas (129).

En este sentido, se evaluó la actividad conjunta del butirato con el forbol 12-miristato 14-acetato (PMA), un activador de la proteína cinasa C (PKC) que induce diferenciación celular en diversas líneas celulares de leucemia, encontrándose que la combinación de 1 mM de butirato con 1, 2 ó 10 nM de PMA durante 24 h, reducía significativamente la expresión del marcador de diferenciación CD11b comparado con el nivel de expresión inducido por el PMA por sí solo, lo que indicaba que la combinación inhibía la maduración celular. Al evaluar los niveles de apoptosis se encontró que mientras que los compuestos individuales no inducían apoptosis, la combinación inducía más del 50% de apoptosis. El análisis del ciclo celular mostró que la combinación no afectaba el porcentaje de células en la fase G0/G1, pero reducía la cantidad de células en fase S y G2. Adicionalmente se probaron diferentes esquemas de aplicación de los tratamientos y se observó que al tratar las células con butirato durante diferentes tiempos antes de aplicar el PMA, se reducía la cantidad de células apoptóticas en comparación con la aplicación de ambos compuestos al mismo tiempo, y que al tratar con PMA las células y posteriormente adicionar el

butirato el efecto era equivalente al de poner ambos compuestos al mismo tiempo. Sus resultados mostraron que el butirato y el PMA actúan sinérgicamente induciendo apoptosis derivada de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y activación de caspasa 8 y Bid (130).

En otro trabajo se observó que el tratamiento durante 6 h con 2.4 nM de bortezomib (un inhibidor del proteasoma), y el posterior cotratamiento durante 20 h con bortezomib y 1 mM de butirato, incrementaba sinérgicamente la apoptosis en células de mieloma múltiple U266. En este estudio se observó que mientras el butirato y el bortezomib solamente inducían ~20% de apoptosis por separado, la combinación inducía ~70%. También se evaluó la administración simultánea de los compuestos, y la administración secuencial de 6 h con el butirato para adicionar posteriormente el bortezomib, pero en estos últimos dos casos el efecto conjunto fue menor que empleando la primera estrategia. El incremento en la muerte celular derivó de cambios en el potencial de membrana mitocondrial, una mayor activación de las caspasas 8, 9 y 3, un aumento en la degradación de PARP, la liberación de citocromo c y de Smac/DIABLO, así como un incremento en la producción de ROS (131).

Además de mostrar actividad contra cáncer de origen hematológico, el butirato ha mostrado actividad contra diversas líneas celulares provenientes de tumores sólidos (132). Sin embargo, debido a que el butirato se produce de manera natural en el colon, el estudio de la participación de esta molécula como potencial agente profiláctico y terapéutico contra el CRC ha cobrado gran relevancia (77). La actividad del butirato en combinación con una amplia gama de moléculas de diversa naturaleza como citocinas (133), ácidos grasos (134,135), modificadores epigenéticos (136,137) y diversas drogas citotóxicas (138) y antiinflamatorias (139), ha sido evaluada en líneas celulares de cáncer de colon encontrándose tanto efectos aditivos como sinérgicos.

En un trabajo por Jones y colaboradores (2004) se reportó que las células Caco-2, las cuales son ampliamente utilizadas para el estudio del cáncer de colon, son resistentes a concentraciones de TNF α de hasta 150 ng/ml, pero que ésta

molécula aunque no afecte directamente la viabilidad, puede sensibilizar a las células hacia el tratamiento con butirato, puesto que al tratar las células con una combinación de 50 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ y 10 mM de butirato durante 48 h se observó una reducción en la viabilidad mayor que la inducida por el butirato (~60% y 35%, respectivamente). La combinación incrementó los niveles de apoptosis (de 2.5% con el butirato, hasta 17.7% con la combinación a las 24 h de tratamiento), disminuyó la proporción de células en la fase G1 del ciclo celular de 21.2% con el butirato, a 16.5% con la combinación, además de incrementar la cantidad de células en sub-G1 (células apoptóticas) (133).

En la misma línea celular (Caco-2), el cotratamiento de 3 mM de butirato con 30 mM de mesalazina (un fármaco antiinflamatorio) inhibió la proliferación celular a través de un efecto aditivo, ya que el butirato disminuyó la proliferación ~30%, la mesalazina ~20% y la combinación ~50% a las 72 h. El cotratamiento incrementó la activación de PARP y de las caspasas 3 y 8, a la vez que disminuyó los niveles de Xiap y survivina (139).

Con respecto a la interacción del butirato con otros modificadores epigenéticos el trabajo de Saldanha y colaboradores (2014) mostró que el tratamiento combinado de butirato con galato de epigallocatequina (un inhibidor de DNA metiltransferasas), a concentraciones fisiológicas, disminuía la viabilidad en tres líneas celulares de cáncer de colon a través de un efecto aditivo. El tratamiento con 5 mM de butirato y 10 μM de galato de epigallocatequina durante 24 h incrementó la apoptosis de ~8% con el butirato, a ~14% con la combinación. Tanto el butirato como la combinación arrestaron a las células RKO y HCT116 en la fase G2/M del ciclo celular y a las células HT-29 en la fase G1. Al estudiar el mecanismo por el cual actuaba la combinación en células RKO, se observó una inducción significativa de p21 dependiente de p53, un incremento en el nivel de $\gamma\text{-H2AX}$ indicativo de daño al DNA, hiperacetilación de la histona H3 asociado a una disminución en la actividad de la histona desacetilasa 1, y reducción en la metilación de islas CpG con disminución en la actividad de la DNA metiltransferasa 1 (137).

Por otro lado, el uso de péptidos catiónicos en combinación con otras moléculas citotóxicas también ha sido evaluada mostrando resultados alentadores. En un trabajo por Zhao y colaboradores (2014) se evaluó la combinación de dos péptidos α -helicoidales derivados de *Helicobacter pylori*, uno compuesto por L-aminoácidos (HPRP-A1) y otro por D-aminoácidos (HPRP-A2), en combinación con los fármacos epirrubicina y doxorubicina. El tratamiento durante 24 h con 16 $\mu\text{g/ml}$ de péptido y 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de fármaco incrementó sinérgicamente la citotoxicidad de ~20% con los tratamientos individuales, a ~70% con la combinación tanto en células Hela como HepG2. Debido a que ambos péptidos presentaron una actividad equivalente se descartó la posible interacción con receptores. Al evaluar la concentración intracelular de doxorubicina a través del tiempo en células Hela, se observó un mayor incremento en la doxorubicina intracelular en las células tratadas con la combinación, así como la pérdida de la integridad de la membrana celular debida a la formación de poros. Con esto se demostró que los péptidos incrementaron el efecto citotóxico al permitir una mayor difusión del fármaco hacia el espacio intracelular. Con respecto a la inducción de apoptosis, a las 24 h el tratamiento con 16 $\mu\text{g/ml}$ de HPRP-A1 se observó un 19.86% de células en apoptosis temprana, con la doxorubicina 1.2 $\mu\text{g/ml}$ un 26.40% y con la combinación un 56.29%. El incremento en la apoptosis se acompañó del incremento en la actividad de las caspasas 3, 8 y 9. Al evaluar el ciclo celular se observó una mayor cantidad de células en sub-G1 (apoptóticas), una disminución en la proporción de células en G1 y un incremento en G2. Para evaluar el efecto de la combinación *in vivo*, se utilizó un modelo murino, en el que los ratones fueron tratados con inyecciones en el sitio del tumor cada dos días durante 15 días en dosis de 1mg/kg peso de doxorubicina, 10 mg/kg de peso de HPRP-A1 o ambos. La combinación mostró un efecto superior a los tratamientos individuales ya que redujo el crecimiento del tumor en un 54.60% mientras que la doxorubicina solo un 31.43% y el péptido un 11.43% (140).

El efecto de la combinación de butirato con AMP solamente ha sido evaluado en un trabajo en donde se utilizó la taquiplesina, un péptido de origen animal obtenido del cangrejo herradura chino. En dicho trabajo observaron que la inhibición

de la proliferación celular que se producía al tratar células de cáncer gástrico BGC-823 con 2 mg/L de taquipesina o 2 mM de butirato, era equivalente a la inhibición inducida por el tratamiento de las células con 1 mg/L de taquipesina en combinación con 1 mM de butirato (~62%). Sin embargo, la combinación mostró un mayor efecto sobre la regulación del ciclo celular, al disminuir la proporción de células en fase S y arrestar una mayor cantidad de células en la fase G1 (5% más respecto a los tratamientos individuales). La combinación también indujo una disminución en la expresión de las proteínas oncogénicas erbB-2 y c-myc mayor a la de los compuestos por separado (141).

Sin embargo, hasta donde sabemos, no existen reportes de la actividad conjunta de AMP con butirato en modelos de CRC.

En nuestro grupo de investigación estamos interesados en conocer la actividad biológica del AMP γ -tionina de chile habanero (*C. chinense*), el cual pertenece a la familia de las defensinas de plantas. Su secuencia se obtuvo de una biblioteca de DNA complementario (cDNA) sintetizado a partir del RNAm aislado del tejido placentario de frutos inmaduros (GenBank AF128239). Consta de 559 nucleótidos, de los cuales 38 corresponden al extremo 5' UTR (no traducido), 324 a la región traducida y 197 al extremo 3'UTR. La proteína putativa traducida a partir del cDNA consta de 107 aminoácidos con un peso aproximado de 9 kDa, que está organizada en tres regiones: un péptido señal en la región amino terminal constituida por los aminoácidos 1 al 25, una región central con ocho cisteínas conservadas entre los aminoácidos 28-75, y una región ácida en el extremo carboxilo terminal, que comprende los aminoácidos 76 al 107. El péptido maduro consta de 50 aminoácidos (Fig. 6), presenta la estructura secundaria representativa de las defensinas de plantas $\beta\alpha\beta\beta$, forma cuatro enlaces disulfuro entre sus ocho cisteínas, tiene una hidrofobicidad de 0.14 Kyte Doolittle y una carga neta de +5.99 (126,142).

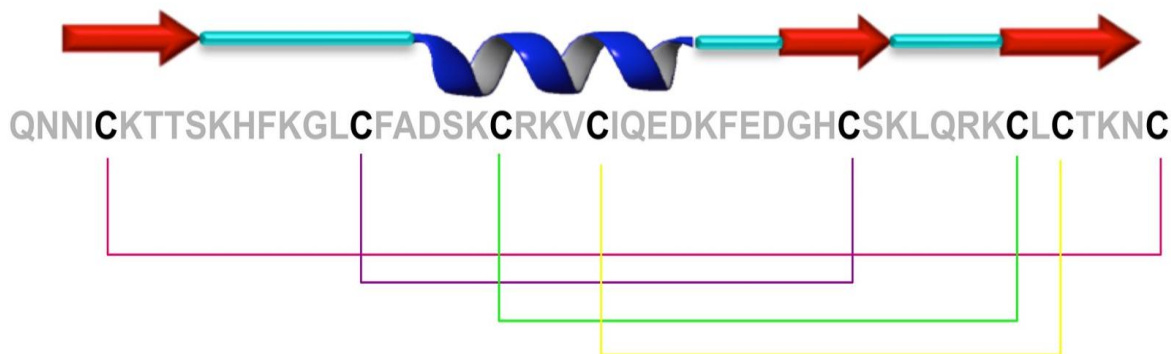


Figura 6. Estructura de la defensina γ -tionina de chile habanero.

Se muestra la secuencia de aminoácidos de la región madura del AMP γ -tionina, la estructura $\beta\alpha\beta\beta$ característica de las defensinas y los cuatro puentes disulfuro que forman las cisteínas (126).

En 2006 se reportó la expresión heteróloga de γ -tionina en células de endotelio bovino y la actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y la actividad citotóxica sobre células de cáncer cervicouterino Hela, del medio condicionado obtenido a partir de las clonas de células que expresaban la defensina (143).

En la actualidad, se está estudiando la actividad de la región madura del péptido sintético, y se ha encontrado que γ -tionina presenta citotoxicidad sobre células de cáncer de mama MCF-7, y de leucemia Jurkat y K562 en un rango de concentraciones de 50-300 $\mu\text{g/ml}$. En las células MCF-7 γ -tionina induce apoptosis e incrementa la expresión de genes de las vías intrínseca (FasL, Fas y caspasa 8) y extrínseca de apoptosis (citocromo c, Apaf-1 y caspasa 9), así como también induce la activación de las caspasas 8 y 9. Las concentraciones que inducen citotoxicidad en células cancerosas, no afectan la viabilidad de células normales de epitelio mamario bovino ni de células mononucleares de sangre periférica, lo que sugiere que el efecto citotóxico del péptido es selectivo hacia células cancerosas (126).

Por otro lado, también se ha demostrado que el tratamiento con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de γ -tionina tiene un efecto inmunomodulador en células de epitelio mamario bovino, al inducir la expresión de genes de las citocinas proinflamatorias $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, y de la citocina antiinflamatoria IL-10, además de inducir la producción de óxido nítrico (144).

La actividad inmunomoduladora de γ -tionina también podría contribuir a su efecto anticanceroso.

Hasta ahora se ha demostrado que γ -tionina presenta actividad antifúngica, citotóxica e inmunomoduladora, lo cual demuestra que es una molécula con potencial terapéutico. Con el objetivo de continuar explorando la actividad biológica de esta defensina y sus posibles aplicaciones, en el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad del butirato en combinación con γ -tionina en líneas celulares de cáncer de colon.

3. JUSTIFICACIÓN

La quimioterapia es una de las estrategias de control más utilizada contra el cáncer. Consiste en una combinación de fármacos que actúan inespecíficamente sobre células normales y transformadas, y que por lo tanto provoca una gran cantidad de efectos secundarios (145). Uno de los principales retos de la investigación en cáncer es desarrollar terapias dirigidas al tumor que ataquen a las células cancerosas de manera selectiva, disminuyendo así la toxicidad hacia los tejidos sanos (111,146).

En la búsqueda de estas terapias alternativas, en los últimos años se han evaluado una gran cantidad de AMP que han mostrado actividad citotóxica específica contra células cancerosas. Sin embargo, una de las limitantes en el desarrollo de este tipo de terapias es el alto costo que representa el obtenerlos de su fuente natural o sintetizar las cantidades requeridas para los fines terapéuticos, por lo que se ha propuesto su uso en combinación con otras moléculas, para disminuir las concentraciones requeridas de péptido (97,108).

Los AMP citotóxicos actúan principalmente sobre las membranas celulares aniónicas, como lo son las membranas de las células cancerosas y las membranas mitocondriales, provocando una desestabilización de su potencial eléctrico o incremento en la permeabilidad, lo que puede desencadenar una muerte celular programada, o incluso una muerte celular necrótica derivada de la lisis de la membrana (148,149).

Por otra parte, el butirato es un SCFA que ha mostrado potencial para ser utilizado en tratamientos contra diversos tipos de cáncer, ya que induce la apoptosis de células transformadas. Sin embargo, debido a que esta molécula se produce de manera natural en el intestino, el estudio de su actividad en modelos de cáncer de colon es de gran relevancia (77).

La producción de butirato disminuye durante la carcinogénesis colorrectal, por lo que las concentraciones de este SCFA no son suficientes para que ejerza de manera efectiva su efecto antitumoral (86,87). Por ello, se propone el uso de

moléculas que puedan incrementar su actividad citotóxica contra las células cancerosas. A diferencia de los AMP, el principal mecanismo de acción del butirato al que se le atribuye su efecto antitumoral es la regulación epigenética que ejerce al ser un inhibidor de la HDAC (150).

De acuerdo a lo antes mencionado, sabemos que tanto el butirato como el AMP γ -tionina de chile habanero presentan actividad citotóxica selectiva contra células derivadas de cáncer y que sus blancos celulares son diferentes. Sin embargo, no se ha establecido si la combinación de estas dos moléculas presenta una interacción que favorezca o incremente su efecto anticanceroso, ni cuál es el mecanismo responsable de su actividad citotóxica conjunta.

En el presente trabajo se propone que la combinación de estas dos moléculas es una estrategia terapéutica con potencial para el tratamiento del cáncer de colon.

4. HIPÓTESIS

La actividad citotóxica del butirato sobre líneas celulares de cáncer de colon es incrementada por el pretratamiento con el péptido antimicrobiano γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del pretratamiento con el AMP γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) sobre la citotoxicidad del butirato en líneas celulares de cáncer de colon (Caco-2 y HCT116), y determinar su mecanismo de acción.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la citotoxicidad del butirato y el AMP γ -tionina sobre las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y HCT116.
- 2) Establecer si el pretratamiento con el AMP γ -tionina aumenta la citotoxicidad del butirato sobre las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y HCT116.
- 3) Determinar el mecanismo de inducción de citotoxicidad de la actividad conjunta del AMP γ -tionina y butirato sobre las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y HCT116.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia metodológica se muestra en la figura 7 y la metodología detallada se describe dentro de cada capítulo de resultados.

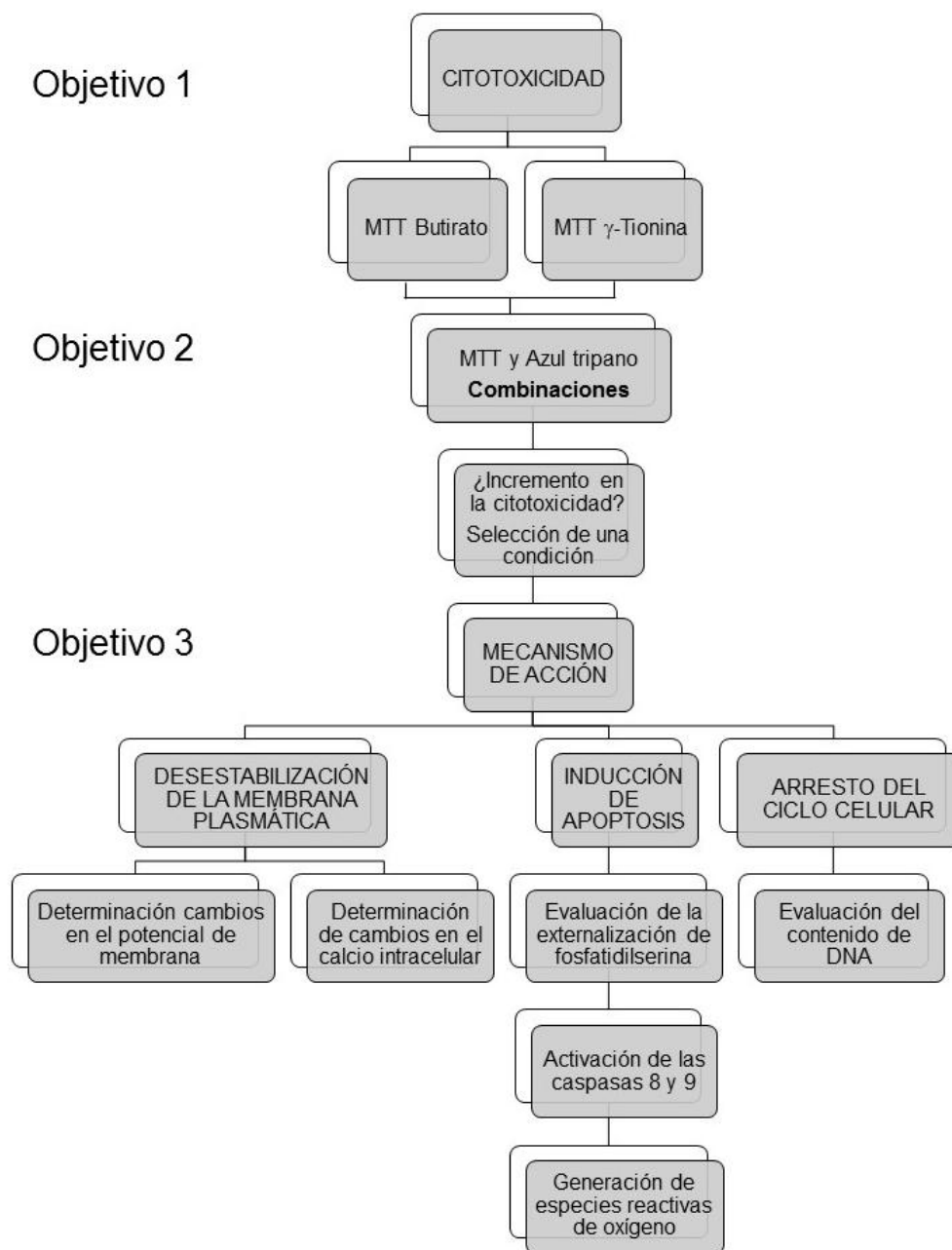


Figura 7. Estrategia metodológica.

7. RESULTADOS

Los resultados generados con la realización del presente trabajo se presentan en 2 capítulos, cada uno corresponde a los resultados de cada línea celular.

- 1) El capítulo I corresponde a las células Caco-2 y se titula: Defensin γ -Thionin from *Capsicum chinense* Enhances Butyrate Induced Cytotoxicity in the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2.
- 2) El capítulo II corresponde a las células HC116 y se titula: El Péptido Antimicrobiano γ -Tionina de Chile Habanero *Capsicum chinense* Sensibiliza a las Células de Cáncer de Colon HCT116 hacia la Muerte Celular Inducida por Butirato

CHAPTER I. Defensin γ -Thionin from *Capsicum chinense* Enhances Butyrate-Induced Cytotoxicity in the Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2

Velázquez-Hernández María Elena, Ochoa-Zarzosa Alejandra, López-Meza Joel Edmundo

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

ABSTRACT

Butyrate acts as a histone deacetylase inhibitor that induces apoptosis and inhibits cell proliferation in colorectal cancer cells (CRC). In the same way, some plant antimicrobial peptides (AMPs) have showed selective cytotoxic activity against different cancer cell lines. One strategy to overcome poor stability or possible toxicity of AMPs is searching for drug interactions that enhance their effects. In this work, we evaluated the combined cytotoxic effect of the AMP γ -thionin and butyrate in Caco-2 cell line. Cells pretreated with γ -thionin (3.5 μ M, 24 h) and then cotreated with γ -thionin and butyrate (50 mM) during 24 or 48 h showed enhanced cytotoxicity than single treatments. The combination reduced the cell proliferation, induced G1 cell cycle arrest and exhibited a higher rate of apoptosis than single treatments. Combined treatment induced caspases 8 and 9 activation to an extent comparable with that of butyrate while γ -thionin did not activate caspases. Generation of ROS preceded the onset of apoptosis and superoxide anion production was slightly superior in cells treated with the combination. In conclusion, treatment with the AMP γ -thionin plus butyrate exhibited higher cytotoxicity in Caco-2 cells than individual treatments.

Key words: butyrate; colon cancer; plant antimicrobial peptides; defensins; γ -thionin; apoptosis; reactive oxygen species.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in men and the second in women worldwide (1). Although some forms of CRC are inherited most of them has been associated with lifestyle factors such as diet (2). Diet composition influences the production of short chain fatty acids (SCFA), the major fermentation products of dietary fiber in the gut. The three principal SCFA are acetate, propionate and butyrate, which generally have a combined concentration of 50–150 mM in the colon (3). SCFA exert nutritional, regulatory, and immunomodulatory functions. Butyrate is the main source of energy for normal colonocytes and plays an important role in colonic epithelium homeostasis (4,5). However, cancerous colonocytes undergo the Warburg effect because that their preferred energy source is glucose. Consequently, butyrate accumulates in CRC cells and functions as a histone deacetylase (HDAC) inhibitor that epigenetically regulates gene expression to inhibit cell proliferation and induce apoptosis (6). Low butyrate production and down-regulation of butyrate transporters occur in the transition from normality to malignancy in human colon. According with this, butyrate levels and its transport into colonocytes is relevant in the health tissue (7,8). Although butyrate and other HDAC inhibitors have showed modest activity against different types of cancer, its combination with antitumor drugs currently used in therapy have demonstrated to provide advantages over single agent therapies *in vitro* (9–11).

An attractive alternative to cancer therapy is the use of antimicrobial peptides, or AMPs. AMPs are relatively small compounds, with 12-100 aa residues and positive net charge that are involved in host defense against pathogens (12). AMPs from plants are grouped based in their structural characteristics in diverse families, being the plant defensins the most studied. Defensins are the most abundant AMPs and have diverse biological functions which include antifungal and antibacterial activity (13). Some members of this family are cytotoxic against different cancer cell lines without affecting normal cells, thus reducing undesirable side effects (14). The antifungal mechanisms of action for plant AMPs include

membrane permeabilization, generation of reactive oxygen species (ROS) with induction of apoptosis, and dysregulation of calcium influx and potassium efflux. However, it is unclear whether the molecular mechanisms underlying the antimicrobial and anticancer activities of AMPs are the same or different (15). Diverse factors, including high cost of large-scale production, toxicity and poor bioavailability have limited the use of AMP as therapeutic agents. One strategy to overcome these disadvantages is searching for drug interactions that enhance their effects (16,17). γ -Thionin from *Capsicum chinense* is a defensin which exerts cytotoxic activity against different cancer cells lines from solid tumor and leukemia, without affecting normal bovine mammary epithelial cells (unpublished data). Therefore, the aim of this study was to evaluate the combined effect of the AMP γ -thionin and butyrate in CRC cells. The results showed that the cells pretreated with γ -thionin and then cotreated with γ -thionin and butyrate showed enhanced cytotoxicity than single treatments.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 (HTB-37) was obtained from American Type Culture Collection. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12) from Sigma, supplemented with 10% fetal bovine serum (Corning), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Corning) and 250 ng/ml amphotericin B (Sigma), and maintained in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Only cells in approximately 90% confluence were used in experiments.

Peptide

γ -Thionin used in this work corresponds to the mature region (NH₂-QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC-

COOH) of the chemically synthesized peptide (Genbank AF128239), which was obtained from Invitrogen. Prior to the assays, the formation of disulfide bonds was accomplished by air oxidation in 20% dimethyl sulfoxide/water (v/v) at a concentration of 1 mg/ml for five days at room temperature. γ -Thionin bond formation was confirmed by TOF-mass spectrometry. For all of the experiments, a final concentration of vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.4% was employed. Stocks were maintained at 4°C.

Cell viability assays

Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and the trypan blue assays. 2×10^4 cells were seeded in 96-well Costar dishes and maintained in supplemented medium for 24 h, then medium was removed, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), and fresh medium without supplements was added and was left 24 h to allow cell synchronization. Then cells were treated with 1) 0.8, 1.7 and 3.5 μ M γ -thionin during 24, 48 or 72 h, 2) 10, 50 and 75 mM butyrate (butyrate stocks were prepared in sterile water) for 24, 48 or 72 h, or 3) with both compounds. For combined treatments cells were pretreated with the peptide 24 h and then treated with the combination for 24 or 48 h. For MTT assay, treatment was removed and replaced with fresh medium containing 0.01% FBS; cells were incubated during 2 h and then 10 μ l MTT (10 mg/ml, Sigma) in PBS was added to each well and incubated for 4 h at 37 °C. Finally, formazan crystals were dissolved with 100 μ l of 10% sodium dodecyl sulfate, and the optical density was measured with a microplate absorbance reader iMark (Bio-Rad) at 595 nm. Optical density of untreated cells was set as 100% viability and actinomycin D (0.2 μ M, Sigma) was used as a positive control. For the trypan blue assay, at the end of the treatments cells were harvested by trypsinization and cell suspension was mixed 1:1 with trypan blue 0.4% (Sigma) and counted in the automated cell counter TC-20 (Bio-Rad).

Nucleus fluorescence staining

For fluorescence staining, 1×10^5 Caco-2 cells were seeded on coverlips pretreated during 1 h with collagen from rat tail (Sigma). Cells were synchronized and treated as indicated previously for cytotoxicity tests. After treatment, the cells were washed with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min. The fixed cells were washed with PBS and were subjected to Syto 9 (Thermo Fisher Scientific) staining ($1.34 \mu\text{M}$) for 30 min at room temperature in the dark. After washing with PBS to remove unbound dye, the stained cells were photographed using a Leica 3000 fluorescence microscope.

Membrane depolarization assay

2×10^4 cells were seeded in 96-well black plates (Thermo Scientific Nunc) pretreated with rat-tail type I collagen (Sigma). Once attached, cells were washed twice with Hanks' HEPES buffer and were incubated with 0.2 mM of 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, DiSC₃(5) (Sigma) in Hanks' HEPES buffer for 30 min at 37°C in a CO₂ incubator. After the incubation time, fluorescence was monitored at intervals of 2 min in a Varioskan Flash reader (Thermo Fisher), at an excitation wavelength of 625 nm and an emission wavelength of 670 nm. Four baseline determinations were made; then the first treatments (vehicle, butyrate, γ -thionin and valinomycin) were applied. Another fifteen readings were performed and the second treatment was applied (butyrate for combined treatment). Fluorescence was monitored by two hours. The K⁺ ionophore valinomycin (0.4 mM, Sigma) was used as positive depolarization control.

Measurement of intracellular calcium

Calcium mobilization was measured using a Calcium Assay Kit (BD Biosciences 640176) according to the manufacturer's instructions. Briefly, confluent cells were washed with PBS and incubated in medium without supplements for 24 h. At the end of this time cells were harvested, counted and centrifuged at 1500 rpm for 5 min. Cells were resuspended in staining solution and 5 mM of probenecid at a density of 1×10^6 cells/ml and incubated for 1 h at 37°C and 5% CO₂, protected from light. Samples were tempered for 20 min before reading. Fluorescence changes were monitored in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). Determination of basal fluorescence was performed for 80 s; at the end of this time treatments were added directly to the cell suspension without interrupting the data collection. Second treatment (butyrate for combined treatment) was added 1 min later. Fluorescence was monitored 280 s. Phorbol 12-myristate 13-acetate (50 mM PMA, Sigma) was used as positive control of increase in intracellular calcium concentration.

Apoptosis analysis

Cells treated as described for viability assessment were harvested by trypsinization after the end of pretreatment and after 6, 12 or 24 h of combined treatment, washed with PBS and stained with Annexin V (Alexa Fluor® 488 annexin V conjugate, Thermo Fisher Scientific) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD, BioLegend) according to the manufacturer's instructions. A total of 10,000 events from the population of interest were collected using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). Actinomycin D 0.5 μM was used as a positive control for apoptosis.

Caspase activity

Detection of the activity of initiator caspases was performed by luminescence using the Caspase-Glo® 8 and 9 Assay kits from Promega. Cells were seeded in

96-well white plates with clear bottom (Costar 3610) and treated as previously described. After 0 and 24 h of treatment the medium was removed and a mixture 1:1 medium/reagent (prepared according to the manufacturer's instructions) was added to each well. Plates were shaken for 1 min and incubated 1 h in the dark. Luminescence was measured using a Varioskan Flash (Thermo Scientific).

Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) production

Cells seeded in 96-well plates and previously synchronized were treated during 45 min (for combined treatment cells were pretreated 15 min with the peptide and the last 30 min with both compounds). After this time, cells were harvested, centrifuged at 1500 rpm for 5 min and resuspended in 20 μ M dihydroethidium (DHE, Sigma) or 20 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA). Cells were incubated protected from light for 30 min at 37°C and 5% CO₂, and then fluorescence of 10,000 events were measured by flow cytometry in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). FeCl₃ 30 μ M was used as positive control.

Cell cycle progression analysis

DNA content in stained nuclei was analyzed by flow cytometry using the BD Cycletest Plus DNA reagent kit. 8×10^4 cells were seeded in 24-well plates (Costar) and synchronized by serum deprivation during 24 h. Treatments were prepared in medium containing 10% heat inactivated FBS. At the end of 24 h of combined treatment, cells were harvested and centrifuged for 5 minutes at 300 g at room temperature. The pellet was resuspended in buffer solution by vortexing at low speed and adjusted at a density of 1×10^6 cells/ml. Cells were centrifuged again and treated with solutions A (trypsin), B (trypsin inhibitor and ribonuclease A) and C (propidium iodide) as indicated in manufacturer's instructions. A total of 20,000 events from the population of interest were collected using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences).

Data analysis

Flow cytometry data were analyzed in the FlowJo V10 software. Results are reported as mean \pm standard error (SE). Comparisons were made using one-way ANOVA *post hoc* Dunnett or Tukey ($p < 0.05$) in the JMP 6.0 software.

RESULTS

γ -Thionin increases the butyrate cytotoxicity in Caco-2 cells

Cells were treated with 10, 50 and 75 mM butyrate or 0.8, 1.7 and 3.5 μ M γ -thionin during 24, 48 and 72 h and viability was assessed by MTT assay. Butyrate did not induce cytotoxicity at 24 h. However, from 48 h showed cytotoxicity in a time-dependent manner (Fig. 1A, upper). The highest effect was observed with 50 and 75 mM at 72 h (~70%), being similar to that of positive control actinomycin D 0.2 μ M. On the other hand, γ -thionin effect in Caco-2 cells was moderated and time dependent (Fig. 1A, below). A decrease in cell viability was observed since 24 h of treatment and reached ~20% after 48 h of treatment.

Further, the combined effect of butyrate and γ -thionin was assessed. Cells were pretreated 24 h with the different concentrations of γ -thionin or vehicle (DMSO 0.4%) and then butyrate was added. Treatments were left by additional 24 h without removal of γ -thionin from the medium. Interestingly, all combinations of γ -thionin with 50 and 75 mM butyrate showed a significant reduction in cell viability (Fig. 1B). The highest effect was observed with 3.5 μ M γ -thionin plus 50 mM butyrate (~30%), which followed an additive pattern, since cells treated with 3.5 μ M γ -thionin exhibited a reduction in cell viability of ~20% and 50 mM butyrate ~10%.

With the aim of exploring the effect of combined treatment on cell proliferation we conducted a trypan blue assay using only the combinations in which we observed increased cytotoxicity: 50 and 75 mM butyrate, and 1.7 and 3.5 μ M γ -thionin. In agreement with MTT results, at 24 h we recovered less live cells from combined treatments that from individual treatments, but there was no difference in the number of dead cells (Fig. 1C, right). Interestingly, the combination of 3.5 μ M γ -

thionin plus 50 mM butyrate reduced ~40% the cell proliferation compared to vehicle, while 3.5 μ M γ -thionin reduced ~20% and 50 mM butyrate ~15% (Fig. 1C, left). Similarly, the combination of 3.5 μ M γ -thionin plus 75 mM butyrate reduced cell proliferation ~50%, while butyrate alone reduced ~30%. This effect also followed an additive pattern. When the treatment was prolonged 24 h (Fig. 1C, right) less live cells were recovered from combined treatments than from butyrate treatments and notably a significant increase in the number of dead cells in combined treatments with butyrate 50 and 75 mM and 3.5 μ M γ -thionin. Since the combination of 50 mM butyrate and 3.5 μ M γ -thionin showed the major effect in a short time with a low butyrate concentration, we selected this condition for the rest of the experiments.

After treatment, butyrate and combination treated cells exhibited a fibroblast-like morphology suggesting the epithelial-mesenchymal transition phenotype induced by HDAC inhibitors in colon cancer cells (18). By staining cells with Syto 9, a nucleic acid fluorescent stain, we observed small round, well defined green dots in cells treated with the vehicle, while in the positive control actinomycin D the nuclei were diffuse and there was a notable increase in the fluorescence intensity reflecting DNA degradation, characteristic of apoptosis. Butyrate and γ -thionin treated cells presented a small amount of cells with the same characteristics that actinomycin D but with the combination, most of cells showed the DNA degradation that confirmed the increase in cell death (Fig. 2).

γ -Thionin and butyrate do not affect the plasmatic membrane integrity of Caco-2 cells

The membrane potential sensitive cyanine dye DiSC₃(5) was used to assess if γ -thionin alone or in combination with butyrate induced membrane depolarization. Upon disruption of the membrane potential, this cationic dye dissociates from the membrane into the buffer, leading to an increase in fluorescence (19). None of the treatments, except the positive control valinomycin 0.4 mM, induced changes in

fluorescence intensity (Fig. 3A). To confirm that cell membrane permeability was not affected, calcium mobilization was measured. Cells treated with PMA 50 mM, a protein kinase C activator that rises intracellular calcium level, showed an increase in fluorescence intensity while there was not a fluorescence change in γ -thionin or butyrate treated cells (Fig. 3B). According to results, cell membrane integrity was not affected by treatment with 3.5 μ M γ -thionin, 50 mM butyrate or both. These results suggested that the mechanism involved in the cell death caused by these treatments is different from membrane disruption.

γ -Thionin increases the butyrate-induced apoptosis in Caco-2 cells

It is known that butyrate induces apoptosis in cancer cells. To assess if there was an increase in apoptosis rate in cells treated with γ -thionin and butyrate or both, flow cytometric detections were conducted. The first determination was registered at the end of pretreatment was designated t_0 . In this condition, only the vehicle and peptide were evaluated and showed about 5% and 9% apoptosis, respectively. Then, butyrate was added and apoptosis determinations were made at 6, 12 and 24 h of combined treatment designated as t_6 , t_{12} and t_{24} . Actinomycin D 0.5 μ M was used as positive control. From t_6 to t_{24} cells treated only with the vehicle maintained a constant rate of apoptosis (~ 8%). However, at t_6 a significant increase in apoptosis was observed in cells treated with γ -thionin (~30%) and with γ -thionin plus butyrate (~50%). Neither butyrate nor actinomycin D showed a significant difference from vehicle at that time. At t_{12} the treatment with γ -thionin increased the number of apoptotic cells (~50%), while the combination only increased the proportion of cells in late apoptosis. In addition, a significant induction of apoptosis was observed in cells treated with actinomycin D (~20%), whereas cells treated with butyrate did not showed effect. Finally, at t_{24} the treatment with γ -thionin increased the proportion of cells in late apoptosis; a significant percentage of apoptotic cells was detected in butyrate treated cells (~20%); actinomycin D and the combination exhibited the greatest effect (~65 and

55%, respectively) (Fig. 4). These results showed that the combination of γ -thionin and butyrate activated apoptosis in a shorter time than single treatments and increased apoptosis rate in Caco-2 cells.

γ -Thionin in combination with butyrate does not increase the activation of initiator caspases induced by butyrate

Once determined that apoptosis was increased in Caco-2 cells by γ -thionin plus butyrate, we measured the activation of initiator caspases of extrinsic (8) and intrinsic (9) pathways at t_0 and t_{24} . Cells treated with vehicle and γ -thionin at t_0 did not show activation of any caspase (Fig. 5) and there was no significant difference between t_0 and t_{24} for vehicle and γ -thionin. Otherwise, butyrate and actinomycin D treated cells showed an increase in the activation of both caspases. Interestingly, the activation of both caspases in γ -thionin plus butyrate treated cells was comparable to that of cells treated only with butyrate. According to these results γ -thionin did not activate caspases 8 and 9, which indicates that γ -thionin induced apoptosis is probably activated by a caspase independent mechanism and that butyrate activated both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways.

The combination γ -thionin plus butyrate increases mitochondrial superoxide production in Caco-2 cells

Frequently, apoptosis is preceded by ROS generation. Therefore, its determination was made after 30 min of combined treatment. All treatments (butyrate, γ -thionin, γ -thionin plus butyrate and positive control FeCl_3) stimulated the generation of ROS in a similar extent when evaluated with the general indicator H2DCFDA. However, the combined treatment showed a significant induction of superoxide anion, detected using the DHE indicator (Fig. 6). This increase in mitochondrial ROS (superoxide anion) correlates with the increase in apoptosis induced by γ -thionin plus butyrate.

The combination γ -thionin plus butyrate induces cell cycle arrest in the G1 phase in Caco-2 cells

Cell cycle progression analysis showed that 24 h of γ -thionin plus butyrate treatment produced a significant arrest in the G1 phase (~87%) compared with control (~77%), and a significant reduction in the S phase (~6%) also compared with control (~18%). Butyrate treated cells also showed an increase in the proportion of cells in G1 and reduction in S but its effect was not statistically significant (~80% cells in G1 and ~14% cells in S). γ -Thionin alone did not show difference with respect to vehicle (Fig. 7). Therefore, cell cycle arrest may contribute to the increase in cytotoxicity of γ -thionin plus butyrate.

DISCUSSION

Butyrate inhibits cell proliferation and stimulates apoptosis in tumor derived cell lines from different origin (20,21). However, its bioavailability is primarily restricted to the colon because it is produced here. Therefore, experiments with colorectal cancer cell lines are physiologically relevant (22). A desirable property of antitumor drug is its selective cytotoxicity for cancer cells without affecting normal cells. Interestingly, some AMP from plants have demonstrated selective cytotoxicity against cancer cells (23).

Caco-2 is a colorectal adenocarcinoma derived cell line which demonstrated intermediate sensitivity to butyrate when compared with another 29 colon carcinoma cell lines (24). Ruemmele *et al.* (2003) treated Caco-2 cells with a wide range of butyrate concentrations during 48 h (0.01–100 mM) and found that the proapoptotic effect only occurred above a threshold concentration of 5 mM butyrate. We tested the effects of three butyrate concentrations (10, 50 and 75 mm). In agreement, we observed a significant reduction in cell viability (~50%) and inhibition of cell proliferation after 48 h of butyrate treatments (Fig. 1). The

concentrations used in this study are in the physiological levels, because luminal butyrate concentrations have been estimated in a range of 10 to 70 mM (25,26).

γ -Thionin from *C. chinense* is a cationic β -defensin that has shown antifungal and anticancer activity. Previously we reported that the conditioned medium from clones of transfected bovine endothelial cells that expressed γ -thionin exhibited a concentration dependent cytotoxic effect against Hela cells (27). Moreover, the synthetic peptide exhibited cytotoxicity against cancer cells from solid tumors (MCF-7) and leukemia (Jurkat and K562) without affecting human peripheral blood mononuclear cells or bovine mammary epithelial cells (unpublished data). The IC_{50} values ranged between 10 and 20 μ M, which are similar to the reported for NaD1 and sesquins (28,29). In this work, we used lower concentrations of γ -thionin (0.8-3.5 μ M) in order to diminish its cytotoxic effect and to allow us to study the combinatory effect with butyrate. As expected, γ -thionin showed a reduction in cell viability of approximately 10-20% (Fig. 1B).

Despite their advantages as anticancer agents, both butyrate and AMP has some therapeutic challenges, as poor stability and bioavailability. One strategy to overcome these disadvantages is their use in combination with other anticancer drugs (30,31). The possible favorable outcomes for drug combination include an improved effect decreasing the concentration and minimizing the development of drug resistance (32). Results showed that γ -thionin plus butyrate induced cytotoxicity in an additive manner (~30%), which was greater than the individual treatments (Fig. 1B). Notably, we recovered less live cells from combined treatment than from individual treatments; 3.5 μ M γ -thionin plus 50 mM butyrate reduced ~40% the cell proliferation, while 3.5 μ M γ -thionin reduced ~20% and 50 mM butyrate ~15% (Fig. 1C, left). This effect was more evident at 48 h (Fig. 1C, right). These observations are in accordance with the results of cell cycle progression analysis and apoptosis. A significant cell cycle arrest in G1 phase after 24 h of combined treatment was observed and fewer cells were recovered from this treatment. Butyrate also increased the proportion of cells in G1 phase but was not statistically significant; probably in an extended time of treatment we could

observe a greater effect as it has been shown that butyrate cell cycle arrest in G1 phase is time and concentration dependent (33). In accordance, co-treatment of the cyclic β -sheet AMP tachyplesin and butyrate in BGC-823 cells increased the proportion of cells in G1 phase and reducing S phase. However, both compounds individually showed the same effect (34). Though, the fact that the combination had a major effect than butyrate let us to think that probably higher concentrations of peptide could exert an observable effect on cell cycle distribution.

Many antimicrobial peptides induce membrane permeabilization as part of their cytotoxic mechanism, which is accompanied by loss of the membrane potential (35,36). These characteristics were evaluated in the present work measuring the intracellular calcium mobilization and changes in the membrane potential (Fig. 3). Results showed that γ -thionin (3.5 μ M) did not affect cell membrane integrity of Caco-2 cells. It has been reported that the effect caused by AMP depends on the concentration, since the same peptide can cause cell lysis at high concentrations or induce apoptosis at low concentrations such as the cathelicidin BMAP-28 (37,38). However, there was no evidence of membrane lysis induced by γ -thionin in MCF-7 cells with a concentration approximately six times higher than the concentration used here. Further research is necessary to elucidate if γ -thionin is able to get inside the cell or if only interacts with membrane components. Otherwise it is known that butyrate induces intracellular calcium release by binding to G-protein-coupled receptors, mainly GPR43 (39). This receptor is frequently lost in colon cancer cells; GPR43 expression was not detected in Caco-2 cells through RT-PCR analyses (40), that is in accordance with our results in which calcium modifications were not observed. According to this, the observed effect in butyrate and combination treatments may be due to the butyrate intracellular action.

Once we discarded the membrane disruption mechanism of cell death, we evaluated apoptosis. γ -Thionin 3.5 μ M induced apoptosis since the 24 h of pretreatment (t_0) (Fig. 4). In MCF-7 cells the IC_{50} (20.3 μ M) of γ -thionin induced apoptosis at earlier time (6 h treatment) as a consequence of higher concentration.

Butyrate also induced apoptosis after 24 h of treatment; this result is in accordance with a kinetic analysis in Caco-2 cells that revealed that induction of apoptosis occurred after approximately 16 h of treatment with butyrate 20 mM (41). The results of combination reflected an additive apoptotic effect that reached ~55% after 24 h of cotreatment. A previous report of combined treatment of butyrate (5 mM) and epigallocatechin gallate (10 μ M) during 48 h in RKO CRC cells showed a similar result with significant apoptosis (~13%) in comparison to the individual treatments (~8%) (42); in the same way, the treatment of Caco-2 cells with 10 mM butyrate and 50 ng/ml TNF- α during 24 h also showed a significant apoptosis (~17%) in comparison to the individual treatments (~2%) (43). However, the apoptotic induction in the present work was higher.

Butyrate treatment (24 h) induced activation of initiator caspases 8 and 9 (Fig.5), suggesting activation of the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. Some works only report activation of caspase 9 in Caco-2 cells treated with butyrate; however, this is not a rule, because other reports support our findings (44–45). These discrepancies could be attributed to differences in concentration, time and detection method. Otherwise γ -thionin did not induce activation of any caspase. Therefore, apoptosis induced by γ -thionin could be mediated through elements different from caspases as Apoptosis-Inducing Factor (AIF) or endonuclease G (Endo G). Release of these factors occurs in response to most intrinsic apoptotic signals, when mitochondrial outer membrane permeabilization has occurred (46). AIF is a mitochondrial oxidoreductase that is released into the cytoplasm and then translocate to the nucleus to induce cell death in response to poly-(ADP-ribose) polymerase-1 activation, resulting in DNA fragmentation independent of caspase activation (47). Endo G is a mitochondrion-specific nuclease that once released from mitochondria is translocate to the nucleus and cleaves chromatin DNA into nucleosomal fragments independently of caspases (48). The cytotoxic effect of many dietary compounds has been linked to AIF release in colon cancer cells. For instance, curcumin (49), chlorophyllin (50) and flavone (51) induced apoptosis independent of caspases in HCT116 cells and

grape seeds extracts in Caco-2 cells (52). Also it has been reported that the human AMP cathelicidin LL37 and its derivative FK-16 activate caspase independent apoptosis related to AIF and Endo G release in HCT116 cells (53,54). In order to confirm the release of these factors by treatment with γ -thionin, further research is needed. A higher concentration of γ -thionin in MCF-7 cells induced the expression of genes from both caspase dependent pathways and activation of caspases 8 and 9; however, frequently the activation of caspase independent apoptosis is accompanied by a caspase dependent apoptosis. According to these results the apoptotic effect of combinatory treatment is through caspase independent and caspase dependent (intrinsic and extrinsic) pathways.

Generation of ROS constitutes one of the earliest intracellular events occurring on induction of apoptotic cell death (55). Treatments with γ -thionin, butyrate and both agents together induced similar amounts of ROS (Fig. 6). Interestingly, the combinatory treatment was superior to single treatments in generation of superoxide anion, an important molecule in apoptosis. This supports the major apoptotic effect induced by combinatory treatment (56–57). Also there are reports of AMP inducing ROS; in particular, similar to present results were reported for the AMP cecropin A, which induces ROS and activates caspases independent apoptosis in the promyelocytic cell line HL-60 (58).

CONCLUSION

Treatment with the AMP γ -thionin in combination with butyrate exhibited higher cytotoxicity in Caco-2 cells than individual treatments. The combination inhibits cell proliferation by induction of cell cycle arrest and increases apoptosis associated to the increase in ROS production. Therefore, combination of butyrate with cytotoxic AMPs could be an attractive strategy for cancer therapy.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
2. Hagland HR, Søreide K. Cellular metabolism in colorectal carcinogenesis: Influence of lifestyle, gut microbiome and metabolic pathways. *Cancer Lett*. 2015 Jan;356(2):273–80.
3. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Sep 8;12(10):661–72.
4. Raskov H. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18151.
5. Sun Y, O’Riordan MXD. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. *Adv Appl Microbiol*. 2013;85:93–118.
6. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol Cell*. 2012 Nov;48(4):612–26.
7. Daly K, Cuff MA, Fung F, Shirazi-Beechey SP. The importance of colonic butyrate transport to the regulation of genes associated with colonic tissue homeostasis. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(4):733–736.
8. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*. 2012 Feb;6(2):320–9.
9. Cho HJ, Kim SY, Kim KH, Kang WK, Kim JI, Oh ST, *et al.* The combination effect of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on radiosensitivity in RKO colorectal cancer and MCF-7 breast cancer cell lines. *World J Surg Oncol*. 2009;7:49.
10. Koprinarova M, Markovska P, Iliev I, Anachkova B, Russev G. Sodium butyrate enhances the cytotoxic effect of cisplatin by abrogating the cisplatin imposed cell cycle arrest. *BMC Mol Biol*. 2010;11(1):49.
11. Miller CP, Singh MM, Rivera-Del Valle N, Manton CA, Chandra J. Therapeutic Strategies to Enhance the Anticancer Efficacy of Histone Deacetylase Inhibitors. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1–17.

12. Franco OL. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front Microbiol.* 2011;2.
13. Tam J, Wang S, Wong K, Tan W. Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals.* 2015 Nov 16;8(4):711–57.
14. Guzmán-Rodríguez JJ, Ochoa-Zarzosa A, López-Gómez R, López-Meza JE. Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1–11.
15. De Coninck B, Cammue BPA, Thevissen K. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol Rev.* 2013 Jan;26(4):109–20.
16. Held-Kuznetsov V, Rotem S, Assaraf YG, Mor A. Host-defense peptide mimicry for novel antitumor agents. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2009 Dec;23(12):4299–307.
17. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol.* 2013;4.
18. Ji M, Lee EJ, Kim KB, Kim Y, Sung R, Lee S-J, *et al.* HDAC inhibitors induce epithelial-mesenchymal transition in colon carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2015 May;33(5):2299–308.
19. Hilpert K, Elliott MR, Volkmer-Engert R, Henklein P, Donini O, Zhou Q, *et al.* Sequence Requirements and an Optimization Strategy for Short Antimicrobial Peptides. *Chem Biol.* 2006 Oct;13(10):1101–7.
20. Pulliam SR, Pellom Jr. ST, Shanker A, Adunyah SE. Butyrate regulates the expression of inflammatory and chemotactic cytokines in human acute leukemic cells during apoptosis. *Cytokine.* 2016 Aug;84:74–87.
21. Wang Y, Hu P-C, Ma Y-B, Fan R, Gao F-F, Zhang J-W, *et al.* Sodium butyrate-induced apoptosis and ultrastructural changes in MCF-7 breast cancer cells. *Ultrastruct Pathol.* 2016 Jul 3;40(4):200–4.
22. Bultman SJ. Molecular Pathways: Gene-Environment Interactions Regulating Dietary Fiber Induction of Proliferation and Apoptosis via Butyrate for Cancer Prevention. *Clin Cancer Res.* 2014 Feb 15;20(4):799–803.
23. Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol.* 2009 Dec;625(1–3):190–4.

24. Wilson AJ, Chueh AC, Togel L, Corner GA, Ahmed N, Goel S, *et al.* Apoptotic Sensitivity of Colon Cancer Cells to Histone Deacetylase Inhibitors Is Mediated by an Sp1/Sp3-Activated Transcriptional Program Involving Immediate-Early Gene Induction. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):609–20.
25. Kaiko GE, Ryu SH, Koues OI, Collins PL, Solnica-Krezel L, Pearce EJ, *et al.* The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell.* 2016 Jun;165(7):1708–20
26. De Preter V, Geboes KP, Bulteel V, Vandermeulen G, Suenart P, Rutgeerts P, *et al.* Kinetics of butyrate metabolism in the normal colon and in ulcerative colitis: the effects of substrate concentration and carnitine on the β -oxidation pathway: Kinetics of butyrate metabolism in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Sep;34(5):526–32.
27. Anaya-López JL, López-Meza JE, Baizabal-Aguirre VM, Cano-Camacho H, Ochoa-Zarzosa A. Fungicidal and Cytotoxic Activity of a Capsicum chinense Defensin Expressed by Endothelial Cells. *Biotechnol Lett.* 2006 Jul;28(14):1101–8.
28. Wong JH, Ng TB. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides.* 2005 Jul;26(7):1120–6.
29. Poon IK, Baxter AA, Lay FT, Mills GD, Adda CG, Payne JA, *et al.* Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *Elife.* 2014;3:e01808.
30. Berni Canani R, Di Costanzo M, Leone L. The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin Epigenetics.* 2012 Feb 27;4(1):4.
31. Wu D, Gao Y, Qi Y, Chen L, Ma Y, Li Y. Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 2014 Aug;351(1):13–22.
32. Chou T-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev.* 2006 Sep 1;58(3):621–81.
33. Coradini D, Pellizzaro C, Marimpietri D, Abolafio G, Daidone MG. Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* 2000;33(3):139–146.
34. Shi S-L, Wang Y-Y, Liang Y, Li Q-F. Effects of tachypiesin and n-sodium butyrate on proliferation and gene expression of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823. 2006;

35. Suttman H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, *et al.* Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol.* 2008 Mar 3;8:5.
36. Baxter AA, Richter V, Lay FT, Poon IKH, Adda CG, Veneer PK, *et al.* The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis. *Mol Cell Biol.* 2015 Jun 1;35(11):1964–78.
37. Risso A, Braidot E, Sordano MC, Vianello A, Macri F, Skerlavaj B, *et al.* BMAP-28, an Antibiotic Peptide of Innate Immunity, Induces Cell Death through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell Biol.* 2002 Mar 15;22(6):1926–35.
38. Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006 Aug;15(8):933–46.
39. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael J-Y, Lannoy V, Decobecq M-E, *et al.* Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *J Biol Chem.* 2003 Jul 3;278(28):25481–9.
40. Tang Y, Chen Y, Jiang H, Robbins GT, Nie D. G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int J Cancer.* 2011 Feb 15;128(4):847–56.
41. Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG, Dionne S, Levy E, Lentze MJ. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut.* 2003;52(1):94–100.
42. Saldanha SN, Kala R, Tollefsbol TO. Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate. *Exp Cell Res.* 2014 May;324(1):40–53.
43. Jones SA, Butler RN, Sanderson IR, Wilson JW. The effect of specific caspase inhibitors on TNF- α and butyrate-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2004 Jan;292(1):29–39.
44. Schwab M, Reynders V, Ulrich S, Zahn N, Stein J, Schröder O. PPAR γ is a key target of butyrate-induced caspase-3 activation in the colorectal cancer cell line Caco-2. *Apoptosis.* 2006 Aug 21;11(10):1801–11.

45. Schwab M, Reynders V, Steinhilber D, Stein J. Combined treatment of Caco-2 cells with butyrate and mesalazine inhibits cell proliferation and reduces Survivin protein level. *Cancer Lett.* 2009 Jan;273(1):98–106.
46. Tait SWG, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene.* 2008;27(50):6452–61.
47. Millan A, Huerta S. Apoptosis-Inducing Factor and Colon Cancer. *J Surg Res.* 2009 Jan;151(1):163–70.
48. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001 Jul 5;412(6842):95–9.
49. Rashmi R, Kumar S, Karunagaran D. Human colon cancer cells lacking Bax resist curcumin-induced apoptosis and Bax requirement is dispensable with ectopic expression of Smac or downregulation of Bcl-XL. *Carcinogenesis.* 2005 Apr;26(4):713–23.
50. Díaz GD, Li Q, Dashwood RH. Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res.* 2003 Mar 15;63(6):1254–61.
51. Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Göke R. Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* 2005 May;10(3):611–7.
52. Dinicola S, Cucina A, Pasqualato A, Proietti S, D'Anselmi F, Pasqua G, *et al.* Apoptosis-inducing factor and caspase-dependent apoptotic pathways triggered by different grape seed extracts on human colon cancer cell line Caco-2. *Br J Nutr.* 2010 Sep;104(6):824–32.
53. Ren SX, Cheng ASL, To KF, Tong JHM, Li MS, Shen J, *et al.* Host Immune Defense Peptide LL-37 Activates Caspase-Independent Apoptosis and Suppresses Colon Cancer. *Cancer Res.* 2012 Dec 15;72(24):6512–23.
54. Ren SX, Shen J, Cheng ASL, Lu L, Chan RLY, Li ZJ, *et al.* FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells. Nie D, editor. *PLoS ONE.* 2013 May 20;8(5):e63641.
55. Teo ITN, Tang JCO, Chui CH, Cheng GYM, Yau MYC, Lau FY, *et al.* Superoxide anion is involved in the early apoptosis mediated by *Gleditsia sinensis* fruit extract. *Int J Mol Med.* 2004 Jun;13(6):909–13.
56. Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Kwon Y-M, Hanson JM, Neish AS. The Bacterial Fermentation Product Butyrate Influences Epithelial Signaling via

Reactive Oxygen Species-Mediated Changes in Cullin-1 Neddylation. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):538–46.

57. Domokos M, Jakus J, Szeker K, Csizinszky R, Csiko G, Neogrady Z, *et al.* Butyrate-Induced Cell Death and Differentiation Are Associated with Distinct Patterns of ROS in HT29-Derived Human Colon Cancer Cells. *Dig Dis Sci.* 2010 Apr;55(4):920–30.

58. Cerón JM, Contreras-Moreno J, Puertollano E, de Cienfuegos GÁ, Puertollano MA, de Pablo MA. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Peptides.* 2010 Aug;31(8):1494–503.

FIGURES

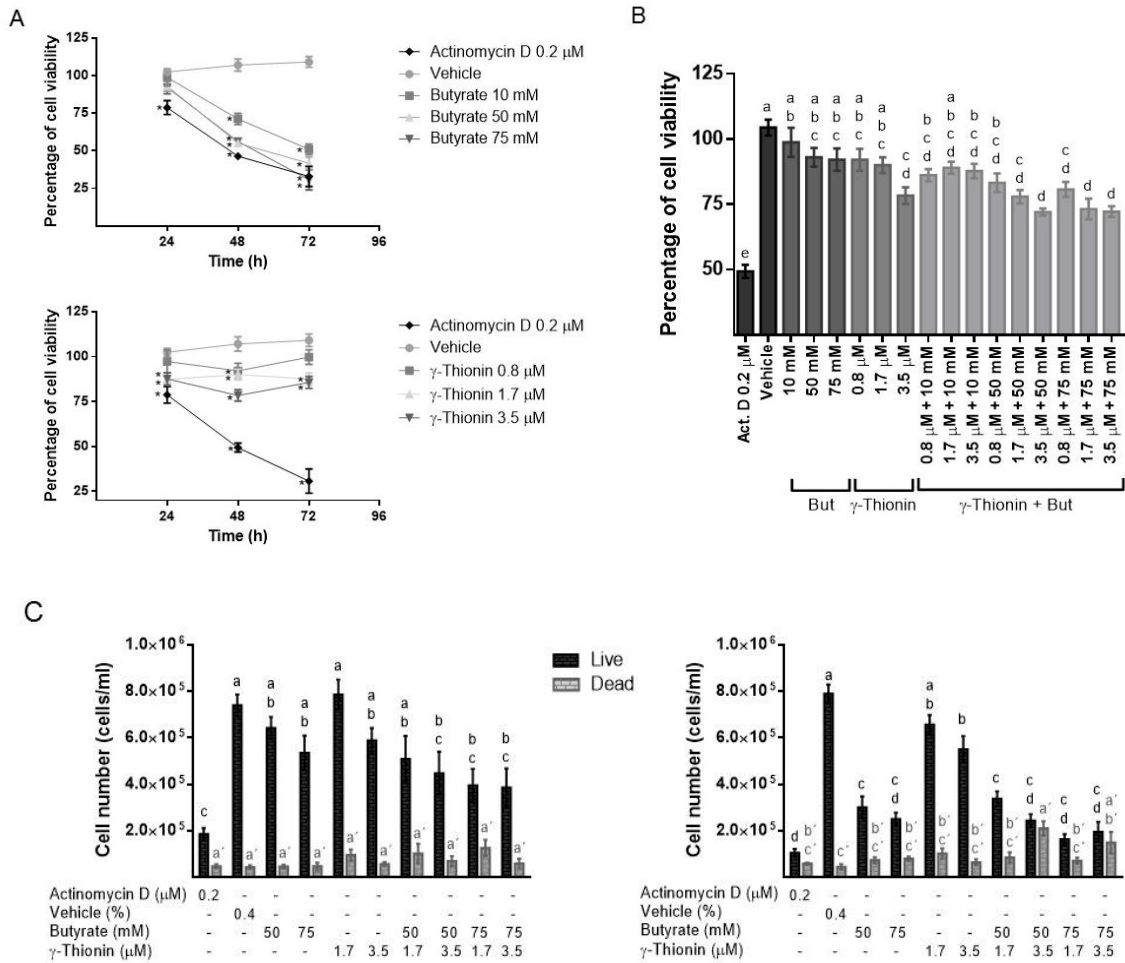


Figure 1. γ -Thionin in combination with butyrate increases cytotoxicity in Caco-2 cells.

(A) Individual cytotoxicity of butyrate and γ -thionin. Cells were treated with different concentrations of butyrate or γ -thionin for 24, 48 and 72 h and viability was analyzed by MTT assay. Optical density of untreated cells was established as 100% viability. Actinomycin D was used as positive control. (*) Represents statistically significant difference from the vehicle DMSO 0.4% (One-way ANOVA *post hoc* Dunnet). (B) Cytotoxicity of butyrate and γ -thionin in combination. Cells were pretreated with γ -thionin or vehicle 24 h before addition of butyrate for additional 24 h without removal of γ -thionin from the medium and viability was analyzed by MTT assay. But: butyrate (C) Inhibition of cell proliferation. Cells treated as in B (left) were stained with trypan blue and viable and non-viable cells were counted. Same treatment prolonged 24 h was also evaluated (right). Graphs represent means \pm SE from at least two triplicated experiments. Different letters above the bars represent statistically significant difference (One-way ANOVA *post hoc* Tukey). Live and death cells were analyzed individually.

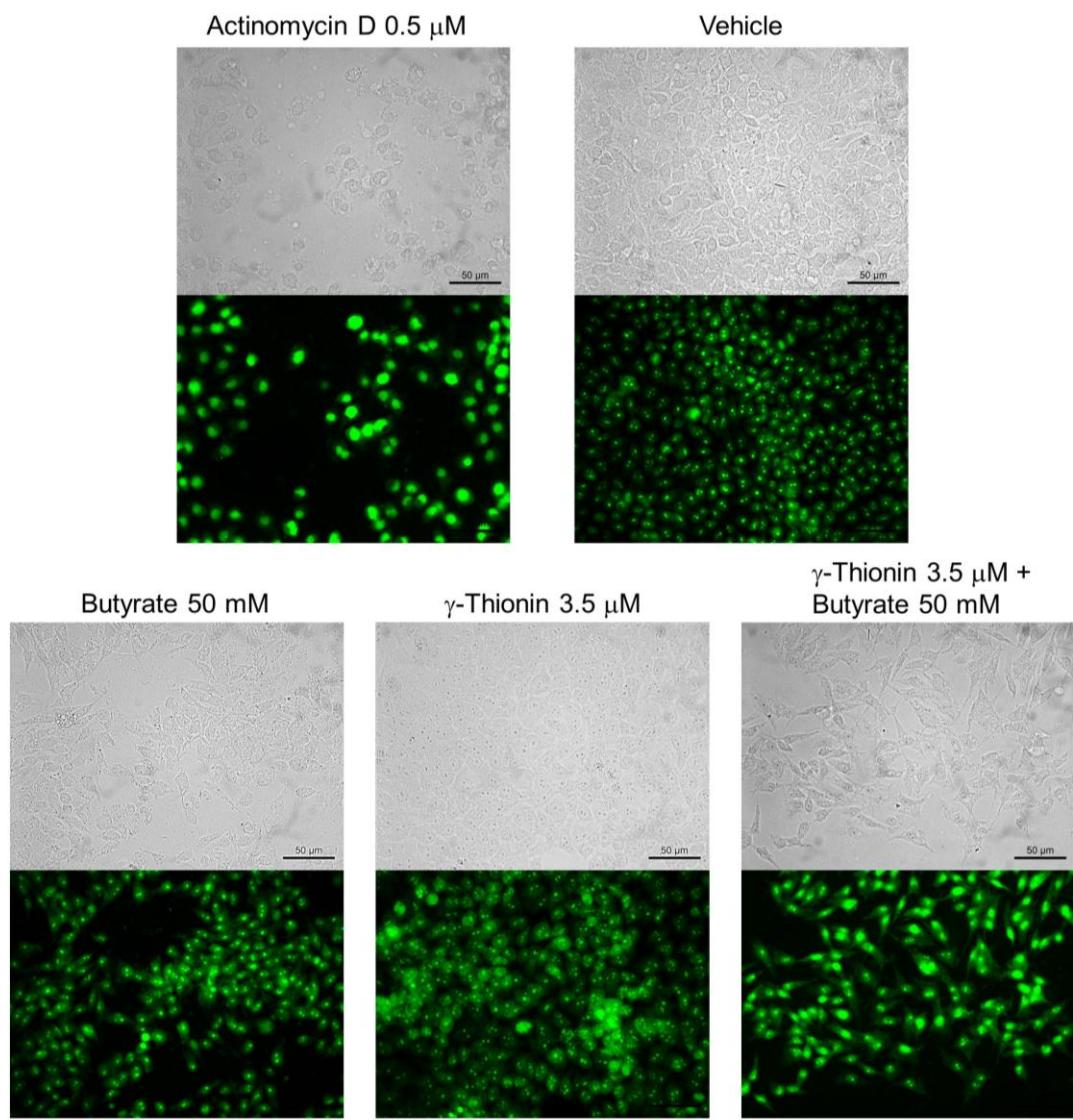


Figure 2. Morphological changes in Caco-2 cells treated with butyrate and AMP γ -thionin.

Cells treated during 24 h with combination were subjected to Syto 9 staining for 30 min at room temperature in the dark. Bright field and fluorescence photographs are shown. Increased green fluorescence is observed within the nucleus of actinomycin D and combination of γ -thionin plus butyrate which denotes DNA degradation.



Figure 3. γ -Thionin in combination with butyrate does not affect cell membrane integrity of Caco-2 cells.

(A) Changes in the membrane potential were measured using DiSC₃(5) dye. Four fluorescence baseline determinations were made and the first treatments (vehicle, butyrate, γ -thionin and valinomycin) were applied. Another fifteen determinations were performed and the second treatment was applied (butyrate to combined treatment). Fluorescence was monitored 120 more min. Valinomycin was used as positive depolarization control. Lines represent means of one experiment performed in triplicate. (B) Calcium mobilization was monitored by flow cytometry. Determination of basal fluorescence was performed for 80 s; at the end of this time treatments were added directly to the cell suspension without interrupting the data collection. Butyrate was added 60 s later to combined treatment and fluorescence was monitored 280 s more. PMA 50 μ M was used as positive control. Arrows indicate the addition of treatments.

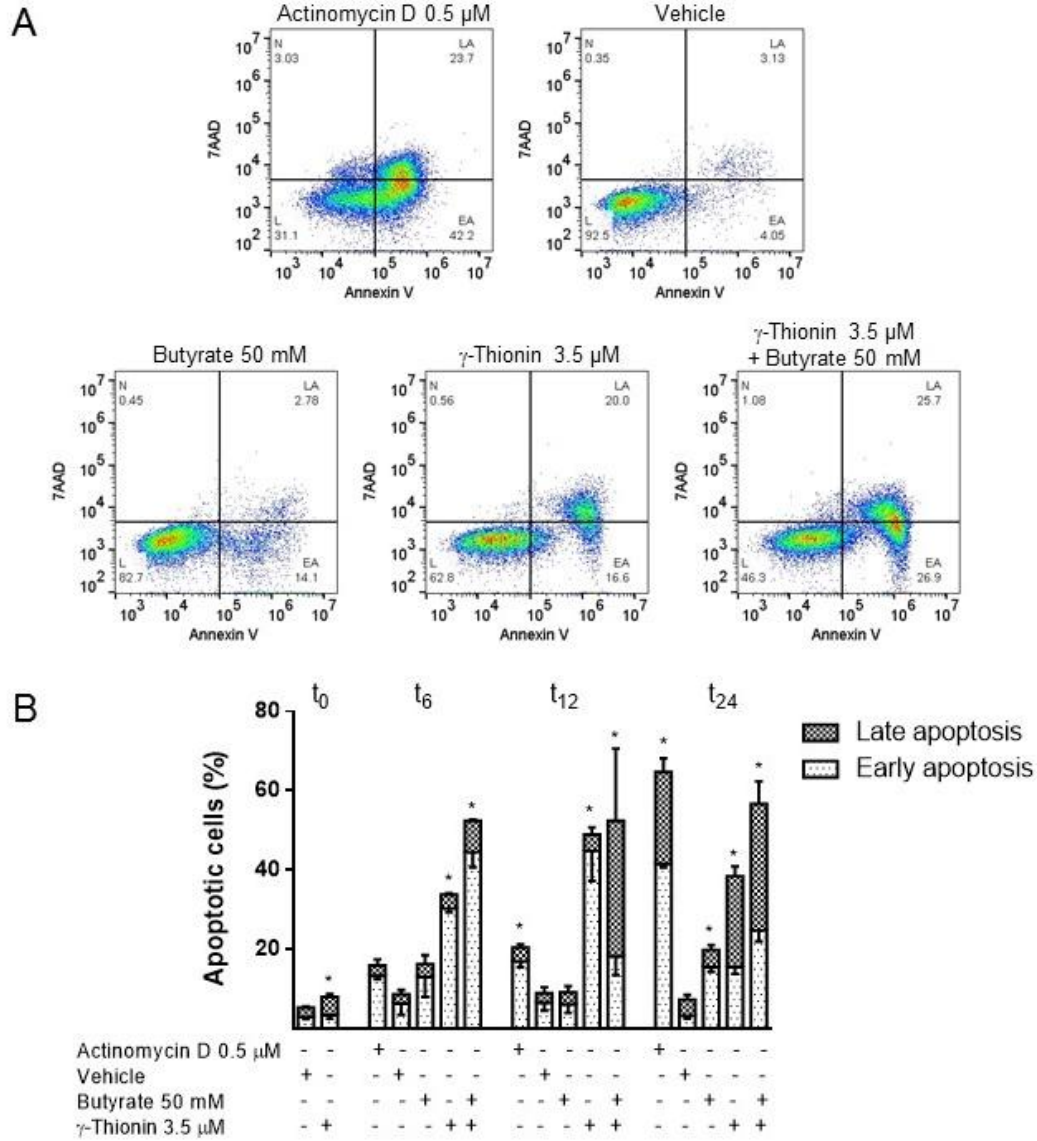


Figure 4. γ -Thionin increases the butyrate induced apoptosis in Caco-2 cells. Cells were pretreated with γ -thionin or vehicle 24 h. Then a group of cells was stained with Annexin V and 7AAD and subjected to flow cytometry (t_0); the rest of cells were treated with γ -thionin and butyrate, butyrate, γ -thionin or vehicle another 6, 12 or 24 h (t_6 , t_{12} and t_{24}) and then subjected to flow cytometry. Actinomycin D 0.5 μ M was used as positive control. A) Representative dot plots of t_{24} are shown ($\sim 10,000$ events/plot). L- live cells, N- necrotic cells, EA- early apoptotic cells and LA- late apoptotic cells. B) The graph shows the percentage of apoptosis in the four evaluated times. Bars represent the mean \pm SE of an experiment performed in triplicate. The comparison was made by ANOVA *post hoc* Dunnett ($p < 0.05$) for each time separately. (*) Indicates statistically significant difference from the vehicle.

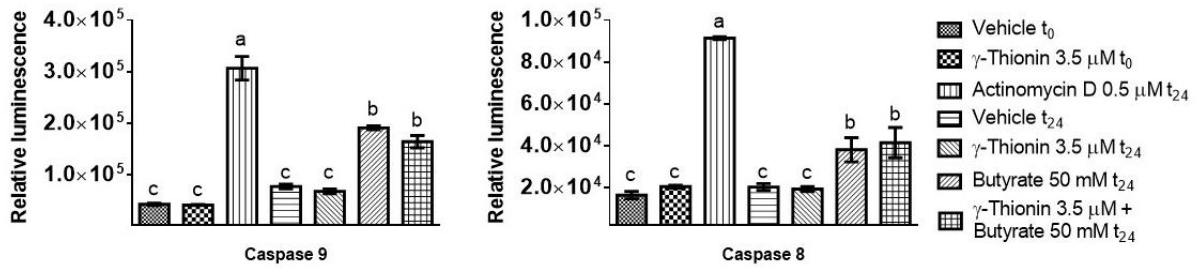


Figure 5. The treatment of γ -thionin in combination with butyrate induces the same extent of caspase activity that butyrate treated cells.

Activation of initiator caspases 8 and 9 was measured using the Caspase-Glo kit from Promega. Luminescence reflects caspase activity. Determinations were made at t_0 and t_{24} . Actinomycin D was used as positive control. Comparisons were made using one-way ANOVA *post hoc* Tukey for each caspase independently. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

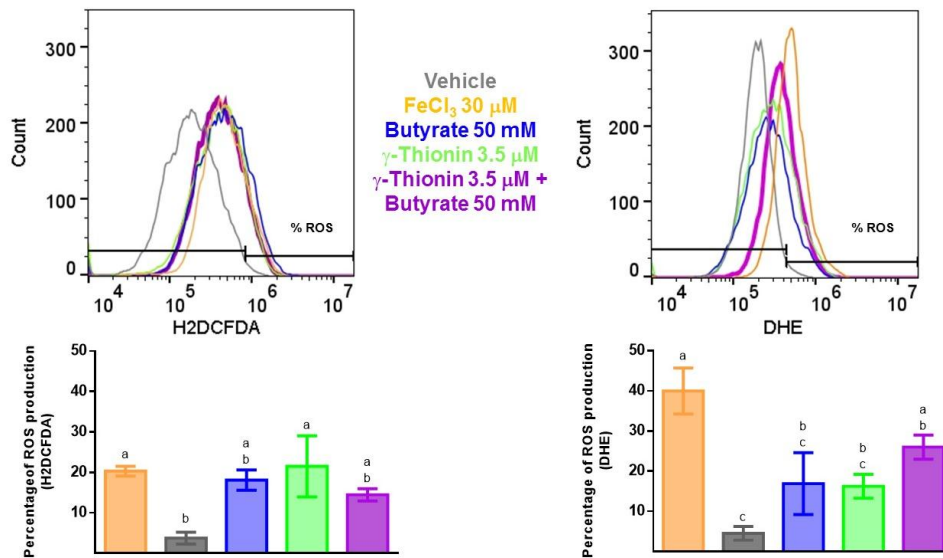


Figure 6. γ -Thionin in combination with butyrate induces ROS generation in Caco-2 cells.

Cells were pretreated with γ -thionin or vehicle 15 min and then treated with γ -thionin plus butyrate, butyrate or γ -thionin another 30 min. Treatment was removed and cells were stained with the general indicator H2DCFDA or the superoxide specific indicator DHE and subjected to flow cytometry. Representative plots of approximately 10,000 events are showed in the upper part. The graphs represent the mean \pm SE of the percentage of ROS production in one experiment performed in triplicate. The comparison was performed using one-way ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$). Different letters above the bars represent statistically significant difference.

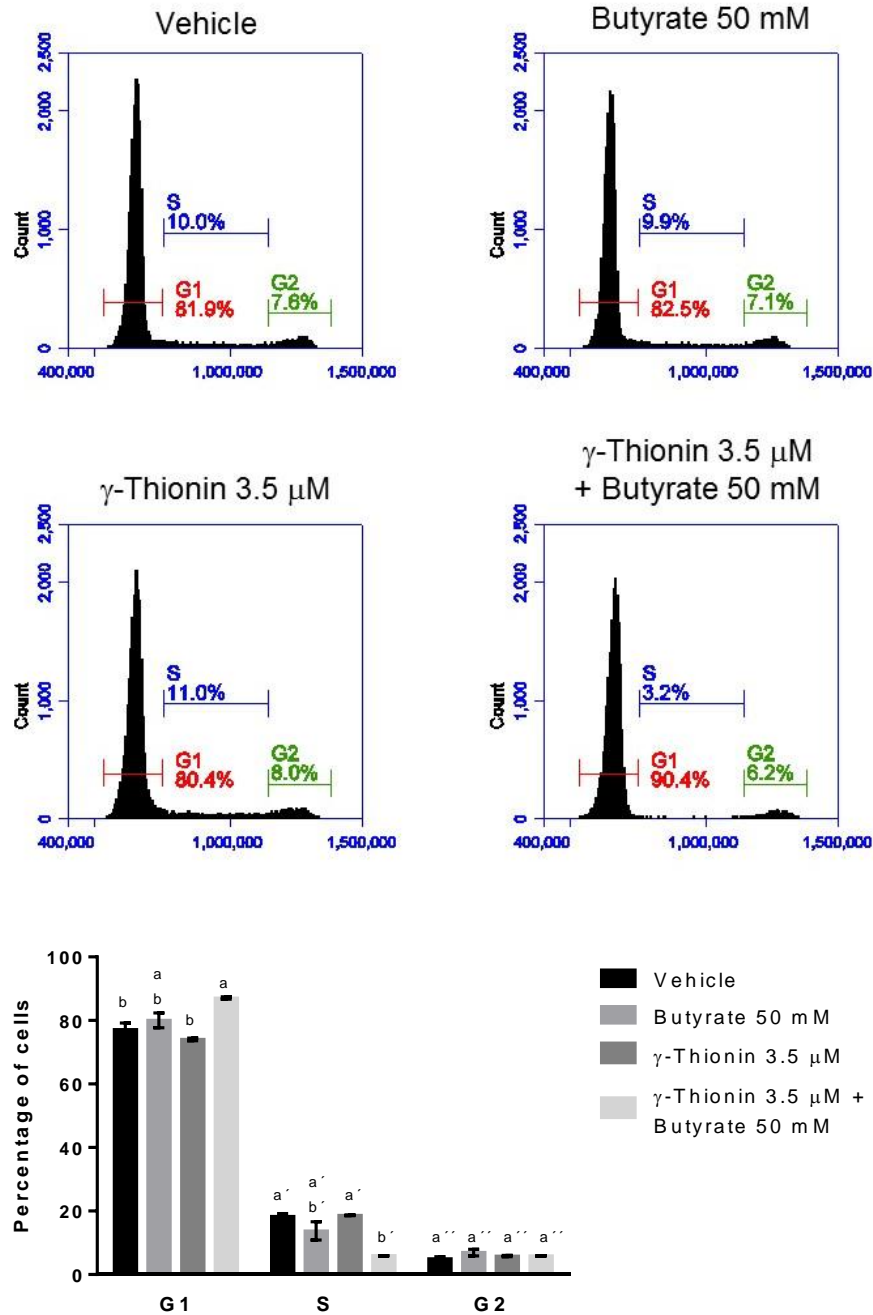


Figure 7. γ -Thionin in combination with butyrate induces cell cycle arrest in Caco-2 cells. Cells were pretreated with γ -thionin or vehicle 24 h and with γ -thionin plus butyrate, butyrate, γ -thionin or vehicle another 24 h. Nucleus were stained with propidium iodide (BD Cycletest Plus DNA reagent) and subjected to flow cytometry to determine the cell cycle progression. Representative plots (upper). Graph represent means \pm SE of one experiment performed in triplicated. Comparisons were made using one-way ANOVA *post hoc* Tukey for each phase (G1, S and G2) independently. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 2. El Péptido Antimicrobiano γ -Tionina de Chile Habanero *Capsicum chinense* Sensibiliza a las Células de Cáncer de Colon HCT116 hacia la Muerte Celular Inducida por Butirato

Velázquez-Hernández María Elena, Ochoa-Zarzosa Alejandra, López-Meza Joel Edmundo

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

RESUMEN

La combinación de péptidos antimicrobianos catiónicos con butirato, una molécula que de manera natural participa en la homeóstasis del epitelio colónico, podría ser una estrategia para combatir el cáncer de colon. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto citotóxico de la combinación de la defensina γ -tionina de chile habanero con butirato en células de cáncer de colon HCT116. El pretratamiento de las células durante 24 h con 3.5 μ M de γ -tionina y posterior tratamiento con γ -tionina y 5 mM de butirato durante 24 y 48 h incrementó la muerte celular en comparación con los tratamientos individuales. γ -Tionina no redujo de manera significativa la viabilidad de manera individual, ni indujo apoptosis; mientras que tanto el butirato como la combinación indujeron apoptosis a partir de las 24 h de tratamiento con activación de las caspasas 8 y 9. La apoptosis y activación de las caspasas exhibida por la combinación fue equivalente a la inducida por el butirato, por lo que el mecanismo implicado en el incremento en la muerte celular por efecto de la combinación es diferente de apoptosis y necrosis. En conclusión, el AMP γ -tionina sensibiliza a las células hacia el tratamiento con el butirato.

Palabras clave: butirato, muerte celular, sensibilización, péptidos antimicrobianos

INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (AMP), entre los que se encuentran las defensinas de plantas, son pequeños péptidos catiónicos que juegan un papel fundamental en la defensa del organismo que los produce contra diversos agentes patógenos como virus, hongos y bacterias. Sus mecanismos de acción incluyen desestabilización de la membrana plasmática que resulta en la lisis celular, o interacción con la membrana que conduce a la formación de poros transitorios y el transporte de péptidos dentro de la célula, poniéndolos en contacto con dianas intracelulares (1,2).

Diversos AMP presentan actividad citotóxica contra células de cáncer a través de la inducción de necrosis (3), apoptosis (4) y/o autofagia (5). En particular, el AMP γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) ha mostrado actividad contra células de cáncer de mamá MCF-7 (IC₅₀ 117.29 μ g/ml) a través de la inducción de apoptosis, mientras que no afecta la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica ni de epitelio mamario bovino, además de que presenta actividad inmunomoduladora en este último modelo (6,7).

A pesar de que los péptidos poseen gran potencial para ser utilizados como agentes anticancerosos estos tienen ciertas limitaciones, como la baja biodisponibilidad debida a sus propiedades fisicoquímicas y un elevado costo de producción a larga escala (8). En la búsqueda de una mayor eficacia en terapias contra el cáncer, se ha visto que el empleo de péptidos catiónicos en combinación con otros agentes quimioterapéuticos puede incrementar el efecto citotóxico y con esta estrategia disminuir las concentraciones de fármacos requeridas, y consecuentemente los efectos adversos (9). Adicionalmente, están siendo desarrolladas aplicaciones innovadoras de los péptidos, como la conjugación de péptidos que penetran las células con fármacos o proteínas proapoptóticas para incrementar la cantidad de fármaco intracelular, así como la selectividad hacia las células cancerosas (10).

Uno de los principales tipos de cáncer a nivel mundial es el cáncer de colon

(11). Se ha visto que durante la carcinogénesis colorrectal los niveles de butirato producidos en el intestino disminuyen. El butirato es un ácido graso que participa en control de la homeóstasis en el epitelio colónico y se ha demostrado que es capaz de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células cancerosas (12,13). Para llevar a cabo dichos efectos, es necesario su transporte al interior de las células donde actúa modulando la expresión de numerosos genes (14). Además de la disminución en la producción intestinal de butirato, la disminución en la expresión de transportadores de butirato en las células cancerosas les confiere cierta resistencia y favorece el desarrollo de los tumores (15). Por lo anterior, el empleo de moléculas que contribuyan a restablecer la actividad del butirato o potencien su efecto citotóxico es una alternativa atractiva para combatir el cáncer de colon.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto citotóxico de la combinación del AMP γ -tionina de chile habanero con el butirato en células de cáncer de colon HCT116. Los resultados mostraron que el pretratamiento con AMP γ -tionina sensibiliza a las células hacia la muerte celular inducida por el butirato, y que el mecanismo de muerte celular no es debido a apoptosis ni necrosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células HCT116 se cultivaron utilizando medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) F12-Ham de Sigma, suplementado con 10% de Suero fetal bovino (SFB, Corning), 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin (Corning) y 250 μ g/ml de anfotericina B (Sigma). Se mantuvieron en cajas para cultivo celular Corning 100 mm x 20 mm, en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C, realizando cambios en el medio de cultivo cada tercer día hasta alcanzar confluencia. Una vez en confluencia, las células se despegaron utilizando Tripsina/EDTA Sigma, se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y se

resuspendieron en medio de cultivo para realizar el conteo celular y utilizarlas en los diferentes ensayos.

Preparación de los tratamientos de γ -tionina y butirato

El péptido γ -tionina utilizado en este trabajo fue sintetizado químicamente (Invitrogen) y corresponde a la región madura de 50 aa (QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC). El liofilizado se mantuvo a -80°C hasta su oxidación. Para la oxidación, el péptido se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 20% en una concentración de 1 mg/ml, y se mantuvo en agitación durante cinco días. La formación de los enlaces disulfuro y la actividad antifúngica fueron comprobadas por medio de espectrometría de masas y conteo de unidades formadoras de colonia de *Candida albicans*, respectivamente. A partir del stock oxidado se prepararon las diluciones correspondientes en DMSO 20%. El butirato de sodio (NaB, Sigma) fue pesado, disuelto en agua inyectable y filtrado con filtro de 0.22 micras. Todos los stocks se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

Ensayo de exclusión de azul tripano

Se sembraron 5×10^4 células HCT116 por pozo en placa Costar de 96 pozos. Se incubaron durante 24 h utilizando medio DMEM F12-Ham suplementado, para permitir su adherencia a la matriz. Al término de este tiempo se realizaron 2 lavados con medio de cultivo Optimem (Gibco), y se incubaron durante 24 h en este mismo medio para permitir la sincronización en el ciclo celular. Al concluir este tiempo se retiró el medio y se aplicaron los tratamientos (preparados en Optimem). Para la evaluación de la actividad conjunta las células se trataron con el péptido γ -tionina durante 24 h y sobre el mismo medio con el péptido se colocó el tratamiento de butirato, dejando actuar la combinación durante 24 y 48 h adicionales. Las células tratadas solo con butirato permanecieron las primeras 24 h con vehículo y sobre el mismo medio se adicionó el butirato. A las células que no se les adicionó butirato se les adicionó el vehículo en que se preparó el butirato

(agua destilada). Se incluyó actinomicina D 0.2 μ M como control positivo. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio, se añadieron 100 μ l de Tripsina-EDTA para permitir el desprendimiento de las células y se añadió un volumen equivalente de medio de cultivo con SFB para inactivar la tripsina. El conteo de células vivas y muertas se realizó en el contador celular automático TC20 Bio-Rad colocando 10 μ l de mezcla 1:1 de suspensión celular y colorante azul tripano 0.4% (Sigma) en las placas para el contador.

Ensayo de citotoxicidad por MTT

Las células se trataron de la misma manera que para el ensayo de exclusión de azul tripano. Al concluir el tiempo de tratamiento se retiró el medio, se adicionaron 100 μ l de medio con 0.1% de SFB y se incubó durante 2 h. Posteriormente se adicionaron 10 μ l de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) 10 mg/ml y se incubó 4 h. Finalmente, los cristales formados se disolvieron adicionando 100 μ l de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% en agua y resuspendiendo durante 1 min. Después de una incubación final de 30 min se realizó la lectura de la placa en el lector de microplacas iMark Bio-Rad, a una longitud de onda de 595 nm. A la absorbancia obtenida se le restó la absorbancia del blanco (medio de cultivo con MTT) y se normalizaron los resultados estableciendo como 100% de viabilidad la absorbancia de células sin tratamiento.

Ensayo de despolarización de la membrana plasmática

Se sembraron 5×10^4 células HCT116 en placas de 96 pozos con fondo negro (Thermo Scientific Nunc), previamente tratadas durante 24 h con colágena de cola de rata (Sigma). Después de 24 h de incubación para permitir su adherencia a la matriz, se retiró el medio y se lavaron las células 2 veces con 100 μ l de buffer Hank's-HEPES. Se incubaron las células durante 30 min en buffer Hank's-HEPES con 0.2 mM de colorante yoduro de 3,3'-di-propil-tio-diocarbocianina DiSC₃(5). Al término de la incubación se realizaron determinaciones de fluorescencia utilizando

el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher). Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de excitación de 625 nm y una longitud de onda de emisión de 670 nm. Se realizaron 4 mediciones basales con intervalos de 2 minutos, a continuación, se aplicaron los primeros tratamientos: valinomicina 0.4 mM (Sigma), vehículo DMSO 0.4%, butirato 5 mM y γ -tionina 3.5 μ M. Se realizaron 15 lecturas con intervalos de 2 min y se aplicó el segundo tratamiento: butirato a la combinación y su vehículo (agua) al resto de los tratamientos. Se realizaron 60 lecturas adicionales, con intervalos de 2 min. En este experimento se incluyó un control de células sin teñir, las cuales se incubaron únicamente con el buffer; se utilizó el ionóforo de potasio valinomicina como control positivo y células sin tratamiento como control negativo.

Ensayo de liberación de calcio intracelular

Se sembraron células HCT116 en una caja Corning 60 mm x 15 mm y se mantuvieron en medio suplementado hasta llegar a un 90% de confluencia. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con medio sin suplementos durante 24 h. Al término de este tiempo se despegaron utilizando tripsina y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se resuspendieron en 5 ml de medio incompleto y se contaron. Se distribuyeron en tubos eppendorff 2.5×10^5 células/tubo y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Posteriormente se resuspendieron en 250 μ l de solución de tinción preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (kit BD 640176) con 5 mM de probenecida. Se incubaron durante 1 h a 37°C y 5% CO₂, protegidas de la luz. Las muestras se atemperaron durante 20 min antes de la lectura y se corrieron utilizando el citómetro BD Accuri C6, realizando la lectura en el canal FL-1. Se realizó una determinación de fluorescencia basal durante 80 s. Al término de este tiempo se adicionó directamente sobre la suspensión celular el primer tratamiento: control positivo acetato de forbol miristato (PMA, Sigma) 30 mM, vehículo DMSO 0.4%, γ -tionina 3.5 μ M y butirato 5 mM. Se continuó con el monitoreo durante 60 s y se adicionó

butirato al tratamiento correspondiente a la combinación. Se continuó el monitoreo durante 5 min adicionales.

Ensayo de apoptosis con Anexina V/7AAD

La preparación de las células y la aplicación de los tratamientos se realizaron de la misma manera que para los ensayos de exclusión de azul tripano. Se realizó una determinación de apoptosis al terminar las 24 h de pretratamiento con γ -tionina (t_0). A partir de esta determinación se aplicaron el resto de los tratamientos, y se realizaron mediciones a las 6, 12 y 24 h (t_6 , t_{12} y t_{24}). Una vez cumplido el tiempo de tratamiento se cosecharon las células utilizando tripsina. Se centrifugaron durante 10 min a 2,500 rpm y 4°C. Se lavó la pastilla con 100 μ l de PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se resuspendió la pastilla en 20 μ l de buffer 1X de Anexina V. Se adicionó 1 μ l de Anexina V acoplada a Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) y 1 μ l de 7-aminoactinomicina D (7AAD, BioLegend) diluido 1:4 en buffer de Anexina V. Se incubaron las células con los fluorocromos durante 30 min en baño de hielo, protegidas de la luz. Se adicionaron 80 μ l de buffer 1X de Anexina V para realizar la lectura en el citómetro de flujo BD Accuri C6, registrando 10,000 eventos de la población de interés. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Flow Jo_V10.

Determinación de actividad de las caspasas 8 y 9

La detección de la actividad de las caspasas 8 y 9 se realizó por medio de luminiscencia utilizando los kits Caspase Glo 8 y Caspase Glo 9 de Promega. La preparación de las células y la aplicación de los tratamientos se realizaron de la misma manera que para los ensayos de exclusión de azul tripano, utilizando placas blancas con fondo transparente Costar 3610. Al término de las 24 h de pretratamiento, y de 24 h de tratamiento combinado, se realizaron las determinaciones de actividad de las caspasas. Para ello se retiró el tratamiento, se adicionó medio fresco con reactivo preparado de acuerdo a las instrucciones del

fabricante 1:1; se agitó la placa durante 1 min y se incubó protegida de la luz durante 1 h. Finalmente se realizó la lectura (longitud de onda de emisión 560 nm) utilizando el módulo LumiSens del Varioskan Flash (Thermo Scientific).

Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se sembraron 5×10^4 células HCT116 por pozo en placa Costar de 96 pozos. Se incubaron durante 24 h utilizando medio suplementado. Al término de este tiempo se realizó un lavado con PBS y se incubaron durante 24 h en medio Optimem sin suplementos y se adicionaron los tratamientos: vehículo DMSO 0.4% y γ -tionina 3.5 μ M. Se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 15 min y se añadió en segundo tratamiento, butirato 5 mM. Se utilizó como control positivo H₂O₂ 50 mM. Se incubó durante 30 min más y se retiró el tratamiento. Las células se cosecharon utilizando tripsina y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en dihidroetidido (DHE) o diacetato de 2',7-dihidrodiclorofluoresceína (H2DCFDA) 20 μ M. Se incubaron durante 30 min a 37°C y 5% CO₂, y se realizó la determinación utilizando el citómetro de flujo BD Accuri C6, realizando las lecturas en los canales FL-2 y FL-1, respectivamente. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Flow Jo_V10.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de todos los ensayos se expresan como la media \pm el error estándar (EE) de al menos un ensayo realizado por triplicado. Las comparaciones se realizaron por medio de ANOVA de un factor *post hoc* Dunnet (utilizando el vehículo como control), o *post hoc* Tukey. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

γ -Tionina sensibiliza a las células HCT116 hacia la muerte celular inducida por butirato

Para evaluar el efecto de la combinación, las células se pretrataron con 1.7 y 3.5 μ M de γ -tionina durante 24 h. Al final del pretratamiento no hubo disminución significativa en la cantidad de células vivas. A continuación, se adicionó el butirato 2.5 y 5 mM y se dejó el tratamiento combinado durante 24 y 48 h. Ni el AMP γ -tionina ni el butirato indujeron una disminución significativa en la cantidad de células vivas en comparación con el vehículo a las 24 h posteriores a la aplicación del butirato (conteo celular con azul tripano), mientras que ambas combinaciones con 5 mM de butirato redujeron significativamente la cantidad de células vivas en aproximadamente un 15% (Fig. 1A). Después de 24 h más de tratamiento, con la combinación se alcanzó una disminución en la cantidad de células vivas con respecto al vehículo de ~45%, con el butirato de ~35% y con γ -tionina ~15%. Interesantemente, además de la disminución en la cantidad de células vivas, se encontró un incremento significativo en la cantidad de células muertas con la combinación de 3.5 μ M de γ -tionina y 5 mM de butirato. El incremento en la citotoxicidad por efecto de ésta última combinación se confirmó por medio del ensayo de MTT (Fig. 1B), ya que la combinación durante 24 h redujo ~25% la viabilidad, mientras que los tratamientos individuales redujeron ~15%.

Los resultados mostraron que, aunque el AMP γ -tionina 3.5 μ M no disminuye significativamente la viabilidad, el pretratamiento con 3.5 μ M de γ -tionina y posterior tratamiento con 5 mM de butirato produce un incremento en la citotoxicidad con respecto al tratamiento con butirato; por lo que esta última combinación fue la que se utilizó para el resto de los experimentos. Los cambios morfológicos inducidos por 24 h de tratamiento combinado reflejan el incremento en la muerte celular (Fig. 1C).

La combinación de γ -tionina con butirato no afecta la integridad de la membrana plasmática de las células HCT116

Debido a que la actividad de muchos AMP deriva de su interacción con la membrana, se utilizó el colorante sensible a cambios en el potencial de membrana DISC₃(5) para evaluar si el péptido γ -tionina solo o en combinación con butirato inducía despolarización de membrana. Ninguno de los tratamientos, excepto el control positivo valinomicina 0.4 Mm (ionóforo de potasio) indujo incremento en la intensidad de fluorescencia derivada del cambio en el potencial de membrana (Fig. 2A).

Con la finalidad de confirmar que la permeabilidad de la membrana celular no estaba siendo afectada por los tratamientos, se realizó un monitoreo de movilización de calcio por citometría de flujo. Ninguno de los tratamientos con γ -tionina, butirato o su combinación modificó los niveles de calcio intracelular, mientras que el control positivo (PMA 50 mM), mostró un aumento en la intensidad de fluorescencia derivado del incremento en el calcio intracelular (Fig. 2B).

De acuerdo con los resultados, γ -tionina, butirato y su combinación, no afectan la integridad de la membrana plasmática de las células HCT116.

γ -Tionina no incrementa la apoptosis inducida por el butirato en células HCT116

Una vez que se comprobó que los tratamientos no comprometían la integridad de la membrana, se procedió a hacer una evaluación de apoptosis por citometría de flujo, utilizando un fluorocromo acoplado a anexina V, una glucoproteína dependiente de calcio que se une de manera específica a la fosfatidilserina (fosfolípido que se externaliza al desencadenarse la apoptosis), y 7AAD, un fluorocromo que se intercala en el DNA de las células cuando la membrana está comprometida. Esta doble tinción permitió discriminar entre las células necróticas (positivas a 7AAD), células apoptóticas (positivas a anexina V) y células en apoptosis tardía (positivas a ambos fluorocromos).

La primera determinación de apoptosis se realizó al finalizar las 24 h de pretratamiento, a la cual se le denominó tiempo cero (t_0). En el t_0 se evaluó solamente el vehículo y el péptido, ya que éstas son las dos condiciones del pretratamiento. A partir de la adición del tratamiento con el butirato se realizaron determinaciones de apoptosis a las 6, 12 y 24 h (t_6 , t_{12} y t_{24} , respectivamente).

Los resultados mostraron un porcentaje de apoptosis con el vehículo de aproximadamente un 13% en el t_0 que alcanzó un 24% en los tiempos t_{12} y t_{24} . Estos porcentajes son similares a los obtenidos en células sin tratamiento (datos no mostrados) por lo que se descartó un efecto del vehículo. En cuanto a los tratamientos, solamente se observó un incremento significativo en la apoptosis al t_{24} , siendo de aproximadamente 40% tanto para el butirato, como para la combinación y el control positivo, actinomicina D. Con la γ -tionina se observaron niveles de apoptosis equivalentes a los del vehículo durante todo el experimento (Fig. 3).

Posteriormente se realizó una determinación de la activación de las caspasas iniciadoras de las rutas extrínseca e intrínseca de apoptosis (8 y 9 respectivamente). Al igual que la determinación de apoptosis, ésta se realizó al t_0 para el vehículo y la γ -tionina y al t_{24} para todos los tratamientos. En los dos tiempos evaluados, el vehículo y la γ -tionina mostraron intensidades de luminiscencia equivalentes, lo que reflejó ausencia de activación de ambas caspasas por efecto de γ -tionina. Las células tratadas con butirato y la combinación, mostraron un incremento significativo en la luminiscencia tanto para la caspasa 8 como para la caspasa 9, que fue equivalente en ambos tratamientos y superior al control con actinomicina D (Fig. 4).

Los resultados indicaron que el AMP γ -tionina no activa ninguna de las caspasas iniciadoras, mientras que tanto el butirato como la actinomicina D activan ambas caspasas. Lo cual significa que estos últimos están activando la apoptosis tanto por vía extrínseca, como intrínseca. La ausencia de activación de caspasas por efecto del péptido coincide con los resultados de la citometría de flujo en los que no se observó incremento en la apoptosis en las células tratadas

con γ -tionina en comparación con el vehículo, y con el ensayo de azul tripano, en el que no se observó disminución significativa en la cantidad de células vivas por este tratamiento. En la combinación, tanto el porcentaje de apoptosis, como la activación de las caspasas fueron equivalentes a los producidos por el butirato, por lo que el incremento en la muerte celular en las células tratadas con la combinación no deriva de un incremento en la apoptosis.

El tratamiento con γ -tionina, butirato o su combinación no induce la producción de ROS en células HCT116

La generación de ROS frecuentemente antecede a la apoptosis, y pueden ser detectadas a tiempos cortos. Por ello, se realizó su determinación después de 30 min de tratamiento combinado. Se utilizó el indicador general de estrés oxidativo H₂DCFDA, que detecta principalmente peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo; y el indicador DHE, el cual es específico para el anión superóxido, cuya principal fuente es la mitocondria. La citometría mostró que ni el butirato, ni la γ -tionina, ni la combinación inducen producción de ROS, mientras que el control positivo, peróxido de hidrógeno si lo hace (Fig. 5). Estos resultados sugieren que la muerte celular inducida por la combinación no deriva de un estrés oxidativo inducido por ROS.

DISCUSIÓN

En la búsqueda de terapias más selectivas contra el cáncer, los péptidos catiónicos han cobrado relevancia, ya que presentan ventajas como una alta especificidad y potencia, y baja toxicidad, además de que pueden atacar simultáneamente diversos blancos celulares. Su uso en combinación con otras moléculas citotóxicas se ha propuesto como una estrategia para incrementar los efectos anticancerosos (16,8).

γ -Tionina es un AMP perteneciente a la familia de las defensinas de plantas que es citotóxica contra las células de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon Caco-2, cuya interacción con otras moléculas citotóxicas no había sido explorada. En el presente trabajo se encontró que el AMP γ -tionina sensibiliza a las células HCT116 hacia la muerte inducida por butirato, ya que al realizar un pretratamiento con 3.5 μ M γ -tionina y posterior cotratamiento con 5 mM butirato durante 48 h, se redujo el porcentaje de células vivas con respecto al control ~45%, mientras que solo se redujo ~35% con el butirato y ~15% con la γ -tionina (aunque ésta última no fue estadísticamente significativa). Estos resultados son semejantes a los reportados para la combinación de butirato con mesalazina (salicilato) (17) y galato de epigallocatequina (polifenol) (18). El tratamiento durante 72 h con 30 mM de mesalazina y 3 mM de butirato en células Caco-2 redujo la proliferación ~48%, mientras que la mesalazina solamente redujo ~19% y el butirato ~32% (17). La combinación de 10 μ M de galato de epigallocatequina con 5 mM de butirato, redujo ~50% la viabilidad, mientras que el butirato solo redujo ~35% y el galato ~10% en células RKO; y en células HCT116 en las que el galato no redujo la viabilidad, el butirato 4 mM la redujo ~60% y la combinación ~70% (18).

Un mecanismo por medio del cual los AMP pueden incrementar el efecto de otros fármacos citotóxicos es induciendo la formación de poros en la membrana, que permiten una mayor acumulación intracelular de fármaco (9). En el presente trabajo no se encontró evidencia de la formación de poros que pudieran estar incrementando la permeabilidad de la membrana hacia el butirato, lo cual sugiere que el incremento en la citotoxicidad no está relacionado con una mayor acumulación intracelular de butirato. En conformidad con estos resultados, γ -tionina tampoco modificó la permeabilidad de células MCF-7 en una concentración 6 veces mayor que la utilizada en el presente trabajo (6).

El porcentaje de apoptosis inducido por el butirato es similar al reportado previamente para esta línea celular (19). Debido a que la concentración de AMP γ -tionina que se utilizó no indujo apoptosis, y que en la combinación no se observó

un incremento en apoptosis ni necrosis, se propone que la defensina está favoreciendo la activación de un mecanismo de muerte celular alternativo, que podría ser la autofagia, ya que el butirato es capaz de inducir autofagia en células HCT116 (20); y se ha demostrado que otros AMP también son capaces de inducir autofagia. Particularmente, el péptido FK-16, es capaz de inducir muerte celular autofágica en células HCT116 (5). Sin embargo, se requieren más experimentos para determinar el mecanismo por medio del cual el AMP γ -tionina incrementa la muerte celular.

El butirato y la combinación indujeron la activación de las caspasas iniciadoras de las rutas extrínseca e intrínseca, lo que sugiere que ambas rutas de apoptosis son activadas por efecto del butirato. Aunque varios trabajos han reportado que la apoptosis inducida por butirato en células de cáncer de colon es primordialmente por vía intrínseca con activación de la caspasa 9 (21-23), también existen reportes de la activación de ambas caspasas (17,24).

Finalmente, no se detectó la inducción de ROS ni con el butirato, ni con la combinación a los 30 min de tratamiento, en coincidencia con un trabajo previo en el que no se detectó una producción significativa de ROS al tratar las células HCT116 con 0.5-2 mM de butirato durante 1.5 h (25). Sin embargo, se ha reportado inducción de ROS por butirato en esta línea celular a las 24 h de tratamiento (19).

CONCLUSIÓN

El AMP γ -tionina de chile habanero sensibiliza a las células de cáncer de colón HCT116 hacia la muerte celular inducida por el butirato y el incremento en la muerte celular es debido a un mecanismo diferente de apoptosis y necrosis.

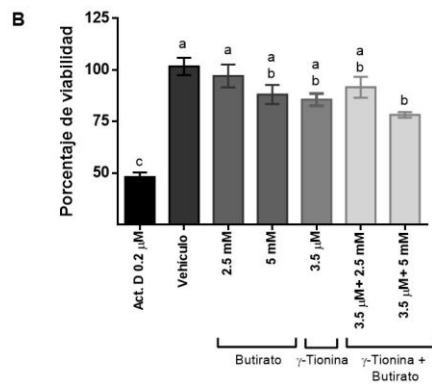
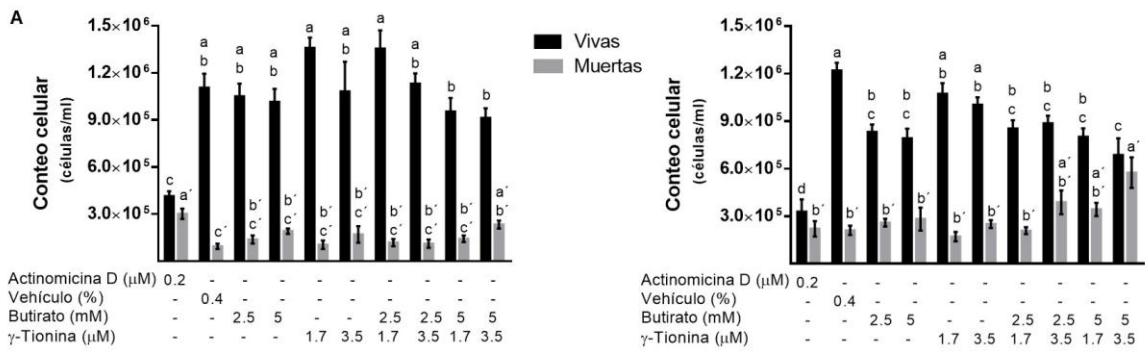
REFERENCIAS

1. Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012 Oct;37(2):207–15.
2. Vriens K, Cammue B, Thevissen K. Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. *Molecules*. 2014 Aug 14;19(8):12280–303.
3. Baxter AA, Richter V, Lay FT, Poon IKH, Adda CG, Veneer PK, *et al.* The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis. *Mol Cell Biol*. 2015 Jun 1;35(11):1964–78.
4. Guzmán-Rodríguez JJ, López-Gómez R, Salgado-Garciglia R, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomed Pharmacother*. 2016 Aug;82:620–7.
5. Ren SX, Shen J, Cheng ASL, Lu L, Chan RLY, Li ZJ, *et al.* FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2013 May 20;8(5):e63641.
6. Guzmán-Rodríguez Jaquelina Julia. Citotoxicidad de las Defensinas γ -tionina (*Capsicum chinense*) y PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) Contra Líneas Celulares Cancerosas. [Morelia, Michoacán]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2016.

7. Díaz-Murillo V, Medina-Estrada I, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides*. 2016 Apr;78:109–18.
8. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol*. 2013;4.
9. Zhao J, Huang Y, Liu D, Chen Y. Two hits are better than one: Synergistic anticancer activity of α -helical peptides and doxorubicin/epirubicin. *Oncotarget*. 2015;6(3):1769–1778.
10. Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Sep 30;61(11):953–64.
11. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
12. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. The role of butyrate on colonic function: *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Oct 26;27(2):104–19.
13. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*. 2012 Feb;6(2):320–9.
14. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol Cell*. 2012 Nov;48(4):612–26.
15. Daly K, Cuff MA, Fung F, Shirazi-Beechey SP. The importance of colonic butyrate transport to the regulation of genes associated with colonic tissue homeostasis. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(4):733–736.
16. Zhang X-X, Eden HS, Chen X. Peptides in cancer nanomedicine: Drug carriers, targeting ligands and protease substrates. *J Controlled Release*. 2012 Apr;159(1):2–13.
17. Schwab M, Reynders V, Steinhilber D, Stein J. Combined treatment of Caco-2 cells with butyrate and mesalazine inhibits cell proliferation and reduces Survivin protein level. *Cancer Lett*. 2009 Jan;273(1):98–106.

18. Saldanha SN, Kala R, Tollefsbol TO. Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate. *Exp Cell Res.* 2014 May;324(1):40–53
19. Tailor D, Hahm E-R, Kale RK, Singh SV, Singh RP. Sodium butyrate induces DRP1-mediated mitochondrial fusion and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mitochondrion.* 2014 May;16:55–64.
20. Tylichová Z, Straková N, Vondráček J, Vaculová AH, Kozubík A, Hofmanová J. Activation of autophagy and PPAR γ protect colon cancer cells against apoptosis induced by interactive effects of butyrate and DHA in a cell type-dependent manner: The role of cell differentiation. *J Nutr Biochem.* 2016
21. Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG, Dionne S, Levy E, Lentze MJ. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut.* 2003;52(1):94–100.
22. Wang L, Luo HS, Xia H. Sodium butyrate induces human colon carcinoma HT-29 cell apoptosis through a mitochondrial pathway. *J Int Med Res.* 2009;37(3):803–811.
23. Zhang Y, Zhou L, Bao YL, Wu Y, Yu CL, Huang YX, *et al.* Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chem Biol Interact.* 2010 May;185(3):174–81.
24. Schwab M, Reynders V, Ulrich S, Zahn N, Stein J, Schröder O. PPAR γ is a key target of butyrate-induced caspase-3 activation in the colorectal cancer cell line Caco-2. *Apoptosis.* 2006 Aug 21;11(10):1801–11.
25. Zeng H, Claycombe KJ, Reindl KM. Butyrate and deoxycholic acid play common and distinct roles in HCT116 human colon cell proliferation. *J Nutr Biochem.* 2015 Oct;26(10):1022–8.

FIGURAS



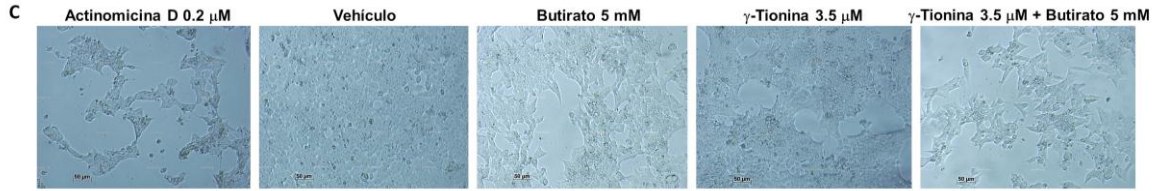


Fig. 1. El AMP γ -tionina sensibiliza a las células HCT116 hacia la muerte celular inducida por butirato.

(A) Las células se pretrataron durante 24 h con el AMP γ -tionina o vehículo (DMSO 0.4%), respectivamente. Al término de este tiempo se añadió el butirato. Se incubaron las células durante 24 (izquierda) y 48 h adicionales (derecha), y se realizó el conteo de células vivas y muertas por medio del ensayo de exclusión de azul tripano. **(B)** La disminución en la viabilidad se evaluó a las 24 h de tratamiento con la combinación por medio del ensayo de MTT, designando como 100% de viabilidad la absorbancia de células sin tratamiento. Se utilizó actinomicina D 0.2 μ M como control positivo. **(C)** Cambios morfológicos inducidos por 24 h de tratamiento combinado. En A y B se muestra la media \pm el EE de dos experimentos por cuadruplicado. Se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* Tukey ($p < 0.05$) para comparar la cantidad de células vivas y muertas por separado. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa.

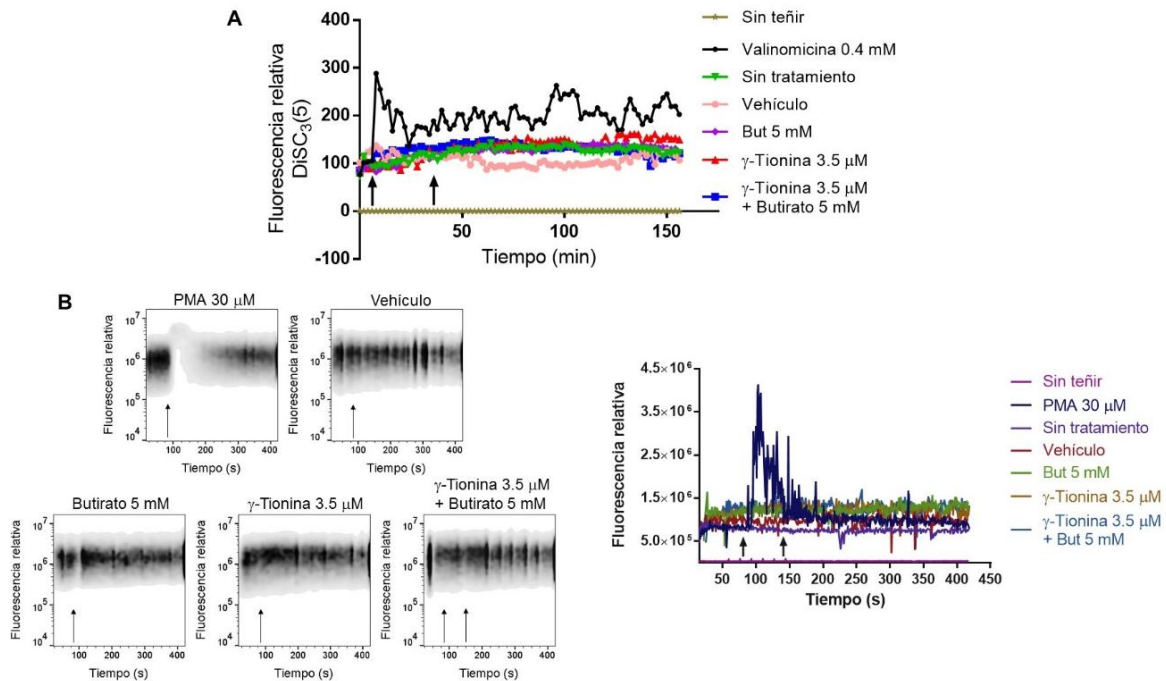


Fig. 2. La combinación del AMP γ -tionina con butirato no afecta la integridad de la membrana plasmática de las células HCT116.

(A) Monitoreo de cambios en el potencial de membrana celular con DISC₃(5). Se realizaron cuatro determinaciones de fluorescencia basal con intervalos de 2 min y se aplicaron los primeros tratamientos (vehículo, butirato, γ -tionina y valinomicina). Se monitoreó la fluorescencia durante 30 min y se añadió el segundo tratamiento (butirato a la combinación y vehículo al resto). La fluorescencia se monitoreó 120 min más. Se utilizaron como control células sin teñir, sin tratamiento y con valinomicina (estas últimas como control positivo). Se representa la media de un experimento realizado por triplicado. **(B)** Determinación de modificaciones en calcio intracelular. Se evaluó por citometría de flujo utilizando un kit de detección de calcio de BD. Se muestran plots representativos de un experimento realizado por duplicado (izquierda) y el gráfico correspondiente (derecha). La fluorescencia basal se monitoreó durante 80 s; al final de este tiempo se añadieron los tratamientos directamente a la suspensión celular sin interrumpir la colección de datos. Se añadió el segundo tratamiento (butirato a la combinación) 60 s después. La medición se realizó durante 280 s más. Se utilizó PMA como control positivo. Las flechas indican la adición de tratamientos.

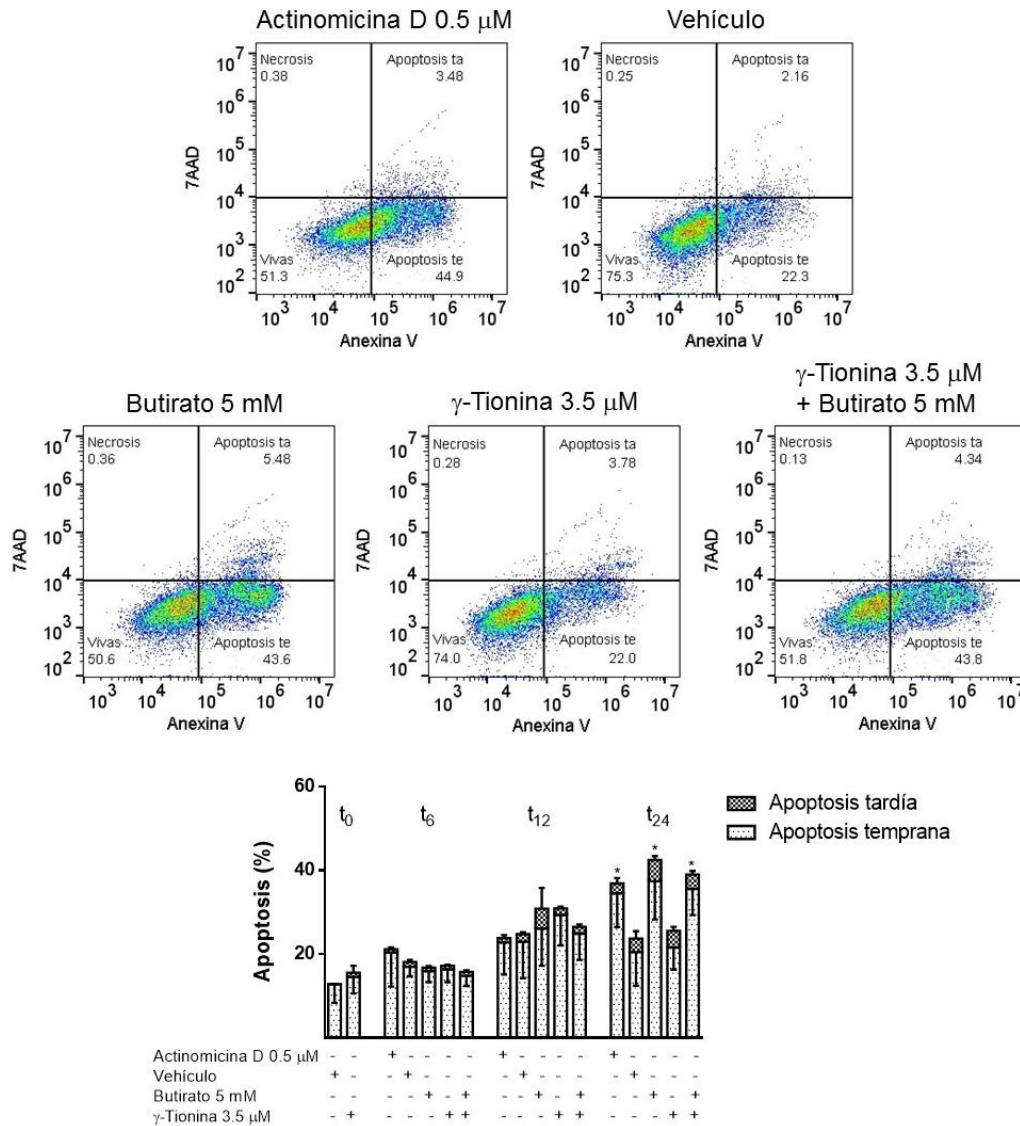


Fig. 3. El AMP γ -tionina no incrementa la apoptosis inducida por el butirato en células HCT116. Se realizaron determinaciones de apoptosis por citometría de flujo utilizando anexina V y 7AAD al finalizar el pretratamiento con γ -tionina (t_0) y 6, 12 y 24 h posteriores a la adición del tratamiento con butirato (t_6 , t_{12} y t_{24} , respectivamente). En la parte superior se muestran plots representativos del t_{24} . La gráfica inferior muestra el porcentaje de apoptosis de los tiempos evaluados. Se muestra la media \pm EE de dos experimentos realizados por duplicado. Se realizaron análisis de ANOVA de una vía *post hoc* Dunnett ($p < 0.05$) para cada tiempo por separado. (*) Indican diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo de cada tiempo. ta: tardía, te: temprana.

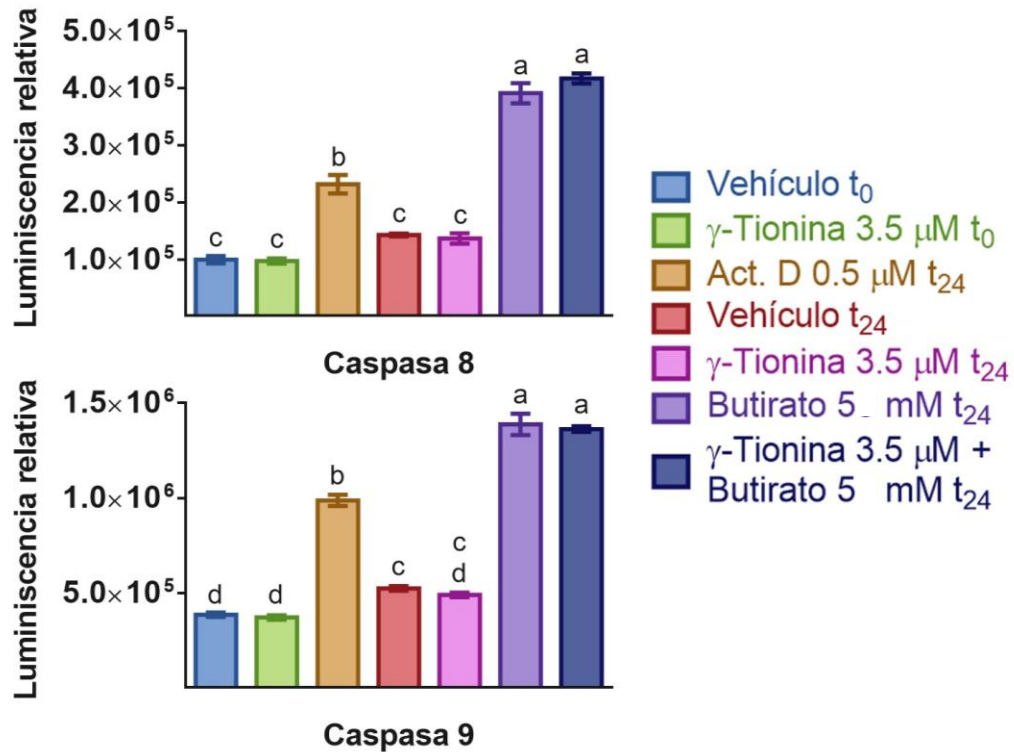


Fig. 4. El AMP γ -tionina no incrementa la activación de caspasas inducida por el butirato en células HCT116.

Se realizó la determinación de la activación de las caspasas iniciadoras 8 y 9 por luminiscencia utilizando el kit Caspase Glo de Promega. Se muestra la luminiscencia al t_0 (al finalizar las 24 h de pretratamiento) y t_{24} (24 h del tratamiento combinado) en las células. Se muestra la media \pm EE de un experimento por triplicado. Se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* Tukey, ($p < 0.05$) para cada caspasa. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa.

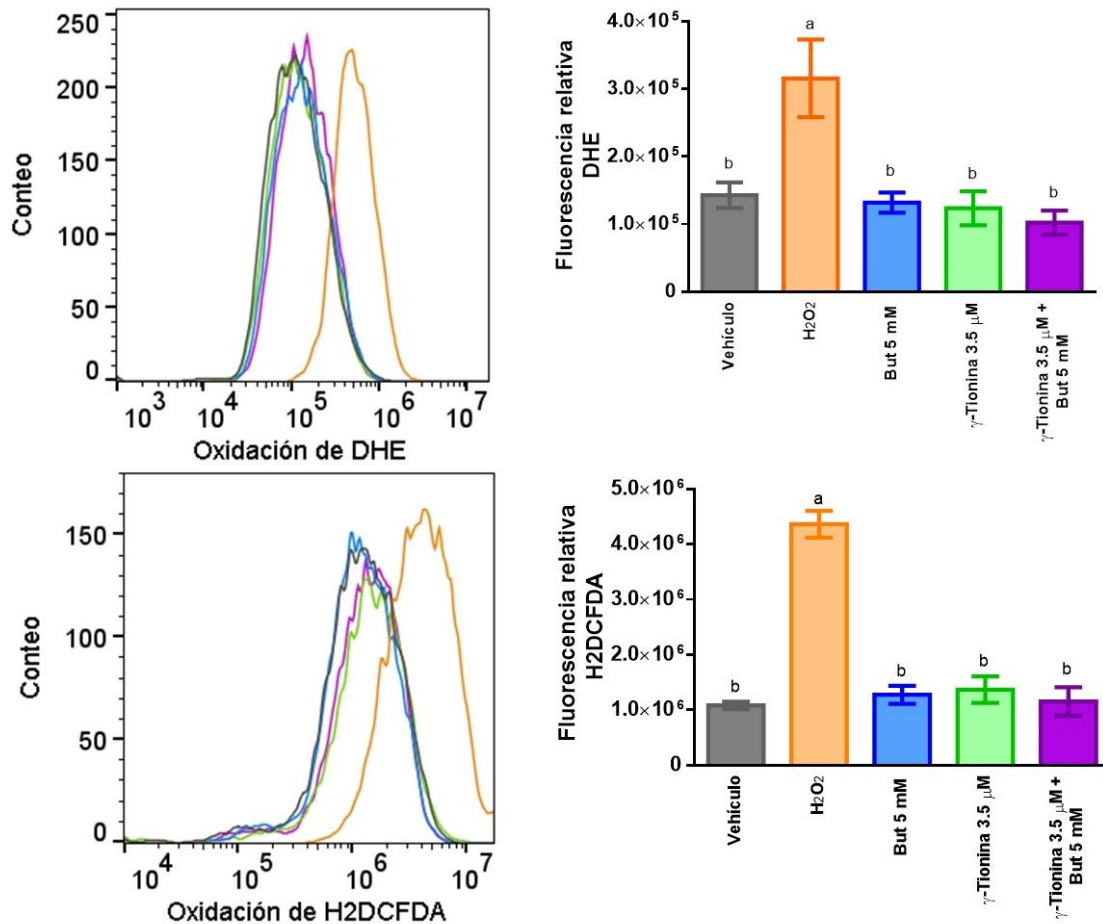


Fig. 5. El tratamiento con el AMP γ -tionina, butirato o su combinación no induce la producción de ROS en células HCT116.

Las células se pretrataron con γ -tionina o vehículo durante 15 min y posteriormente con butirato o con la combinación durante 30 min. Se retiró el tratamiento y se incubaron con el indicador de ROS general H₂DCFDA o con el indicador específico de ROS mitocondrial DHE durante 30 min a 37°C y 5% CO₂. A la izquierda se muestran los plots representativos de cada uno de los indicadores y a la derecha el gráfico que representa la media \pm EE de la intensidad de fluorescencia de un experimento realizado por triplicado. La comparación se realizó por medio de ANOVA de una vía *post hoc* Tukey, ($p < 0.05$). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas.

8. DISCUSIÓN GENERAL

El butirato es un SCFA, que tiene la capacidad de inducir apoptosis e inhibir la proliferación de células cancerosas. Debido a que esta molécula se produce de manera natural en el intestino, el estudio de su actividad en modelos de cáncer de colon es de gran relevancia (77).

Las características moleculares de los tumores juegan un papel importante en la respuesta al tratamiento, por lo cual es importante utilizar líneas celulares que representen la heterogeneidad observada en ellos. En el presente trabajo, se utilizaron las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y HCT116, las cuales representan estadios avanzados de cáncer de colon con un diferente fondo genético. En diversos trabajos se ha encontrado que los pacientes con tumores que presentan inestabilidad microsatelital ligada a defectos en el sistema de reparación de errores de apareamiento como la que presentan las células HCT116, representa aproximadamente un 15% de los tumores de CRC y se asocia a un buen pronóstico en comparación con los pacientes con tumores que carecen de inestabilidad microsatelital. Otra de las particularidades de la línea celular HCT116 es que contiene una alta proporción de células madre cancerosas, que han perdido la capacidad de diferenciarse y que representan un modelo de cáncer agresivo y poco diferenciado que se correlaciona clínicamente con metástasis de ganglios linfáticos (151-154). Por el contrario, las células Caco-2 no presentan inestabilidad microsatelital, sino inestabilidad cromosómica, la cual se asocia a un mal pronóstico, y es una característica relevante, ya que se presenta en aproximadamente un 65-70% del total de CRC. Esta línea celular deriva de un adenocarcinoma y presenta la capacidad de diferenciarse. Adicionalmente, las mutaciones en APC y P53 que alberga tienen una alta asociación con metástasis, por lo que es un buen modelo para estudiar CRC avanzado de mal pronóstico (155,156).

Los resultados mostraron que las células Caco-2 son más resistentes al butirato, ya que se requirieron concentraciones superiores a 10 mM para observar un efecto citotóxico, mientras que en las células HCT116 se observó citotoxicidad

a partir de 2.5 mM. Esto coincide con un reporte previo donde se evaluó la sensibilidad de 30 líneas celulares de cáncer de colon hacia el butirato, en el que las células HCT116 se colocaron dentro de las más sensibles, mientras que las Caco-2 se colocaron dentro de las de sensibilidad intermedia (157). La mayor sensibilidad de las células HCT116 hacia el butirato puede atribuirse al status silvestre del gen *TP53*, ya que se ha demostrado que el butirato inhibe el crecimiento de manera más eficiente en células con esta característica (158). Además, las líneas celulares en las que el butirato incrementa la actividad de la ruta Wnt, como HCT116, son más susceptibles al efecto proapoptótico del butirato. La activación de la ruta Wnt está relacionada con mutaciones en KRAS y β -catenina (159,160). Sin embargo, se requiere evaluar la actividad de la ruta Wnt en este modelo de estudio para determinar su participación.

Por otro lado, los AMP son moléculas regularmente catiónicas que forman parte del sistema de defensa de todos los organismos vivos y muchos de ellos han mostrado además de su actividad antimicrobiana, actividad citotóxica e inmunomoduladora además de que han demostrado tener actividad en terapias de combinación (117,161).

La citotoxicidad de la combinación de butirato con AMP solamente ha sido reportada en un trabajo donde se utilizó la taquiplesina, un péptido de cangrejo herradura (141). En dicho trabajo, se observó inhibición de la proliferación celular al tratar células de cáncer gástrico BGC-823 con 1 mg/L de taquiplesina en combinación con 1 mM de butirato (~62%). La combinación disminuyó la proporción de células en fase S y detuvo una mayor cantidad de células en la fase G1, resultados similares a los que se obtuvieron en este trabajo con las células Caco-2, en que la combinación redujo la fase S e incrementó la fase G1 ~7% en comparación con el butirato (Figure 7). El hecho de que no se halla observado un efecto sobre el ciclo celular con γ -tionina, pero sí con la combinación, sugiere que γ -tionina está regulando factores importantes del ciclo celular y probablemente con concentraciones más elevadas se pueda observar un efecto sobre el ciclo celular.

Un dato relevante de este trabajo es que en ambas líneas celulares se observó un efecto aditivo en la reducción de las células vivas (Figure 1C y Fig. 1A). A las 24 h de tratamiento con la combinación se observó una reducción de ~40% en las células Caco-2, siendo mayor al observado de manera independiente (γ -tionina ~20% y butirato ~15%). Por otro lado, en HCT116 a las 48 h de tratamiento combinado se observó una reducción de ~45%, mientras que el tratamiento con γ -tionina inhibió ~15% y butirato ~35%. Estos resultados son semejantes a los reportados para la combinación de butirato con el salicilato mesalazina (139) y con el polifenol galato de epigallocatequina (137).

Un mecanismo por medio del cual los AMP pueden incrementar el efecto de otros fármacos citotóxicos es induciendo la formación de poros en la membrana, que permiten una mayor acumulación intracelular de fármaco (140). En el presente trabajo no se encontró evidencia de la formación de poros que pudieran estar incrementando la permeabilidad de la membrana hacia el butirato en ninguna de las dos líneas celulares, ya que no hubo modificación del potencial de membrana, ni en los niveles de calcio intracelular (Figure 3 y Fig. 2), por lo cual se sugiere que el incremento en la citotoxicidad no está relacionado con una mayor acumulación intracelular de butirato. En congruencia con nuestros resultados, el AMP γ -tionina tampoco modificó la permeabilidad de células MCF-7 en una concentración 6 veces mayor que la utilizada en el presente trabajo (126).

El AMP γ -tionina de chile habanero mostró efecto citotóxico hacia las células Caco-2 a través de la inducción de apoptosis (Figure 4). Mientras que la misma concentración de γ -tionina no redujo significativamente la viabilidad ni indujo apoptosis en células HCT116 (Fig. 3). Estos resultados coinciden con los reportados para el péptido Cn-AMP1 de *Cocos nucifera L.* que indujo citotoxicidad en células Caco-2 de manera dependiente de la concentración mientras que con las mismas concentraciones (12.5-400 μ M) no afectó la viabilidad de células HCT116 (162). Las diferencias en la sensibilidad hacia los AMP se ha asociado con diferencias en los componentes de las membranas celulares, ya que se ha visto que los péptidos interactúan con componentes de las membranas como el

fosfatidilinositol 4,5-bifosfato o la glucosilceramida para inducir la lisis o penetrar al interior celular (124).

En nuestro grupo de trabajo previamente se demostró que el AMP γ -tionina 117.29 $\mu\text{g/ml}$ (20.3 mM) induce apoptosis en células MCF-7, y que activa en tiempos cortos la expresión de genes característicos de la vía intrínseca de apoptosis y a tiempos largos genes de la vía extrínseca, además de activar las caspasas iniciadoras 8 y 9. Sin embargo, no se evaluó la participación de moléculas responsables de apoptosis independiente de caspasas (126). En el presente trabajo, el AMP γ -tionina indujo apoptosis sin activar las caspasas iniciadoras en células Caco-2; sin embargo, se utilizó una concentración más baja que la utilizada en células MCF-7, por lo que no se descarta que concentraciones más elevadas pueda inducir la activación de caspasas en esta línea celular. Se ha reportado que el blanco intracelular de algunos AMP como BMAP-28 es la mitocondria (148); esto deriva del hecho de que las membranas mitocondriales son ricas en componentes aniónicos (163). La generación de ROS sugiere que la apoptosis inducida por γ -tionina en células Caco-2 deriva del estrés mitocondrial y de ser así, factores inductores de apoptosis independiente de caspasas como AIF y Endo G podrían estar siendo liberados de la mitocondria (164). Un péptido con actividad similar a la observada en el presente trabajo es la cecropina A, la cual induce apoptosis independiente de la activación de las caspasas 8 y 9, así como también induce generación de ROS en células de leucemia HL-60 (165). El péptido FK-16 induce apoptosis independiente de caspasas, pero además induce muerte celular autofágica en células HCT116 (115). Debido a que no se observó apoptosis por efecto de la γ -tionina en células HCT116, pero si se observó un incremento en la muerte celular al tratar las células con la combinación de γ -tionina y butirato, se sugiere que el péptido podría estar promoviendo la muerte celular autofágica, sin embargo, se requiere realizar evaluaciones para demostrar la participación de este mecanismo, como puede ser la formación de autofagosomas. Adicionalmente, en nuestro grupo de trabajo también se reportó que en concentraciones que no afectan la viabilidad, el AMP γ -tionina presenta efectos

inmunomoduladores (144); debido a que en esta línea celular no se observó generación de ROS, el péptido podrían estar afectando otros blancos celulares diferentes a la mitocondria.

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se proponen dos modelos que podrían ser responsables de la citotoxicidad conjunta de γ -tionina y butirato en las células Caco-2 (Figura 8) y HCT116 (Figura 9), respectivamente.

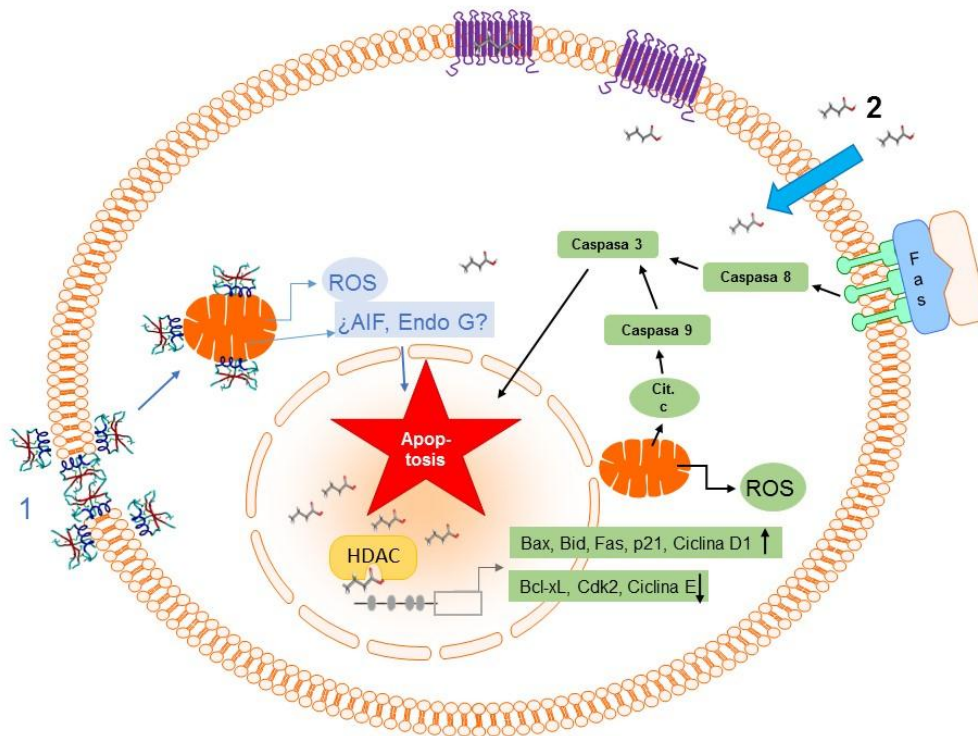


Figura 8. Modelo del mecanismo de acción de la actividad conjunta de γ -tionina y butirato en las células Caco-2.

Primero se adiciona el AMP γ -tionina. Este interactúa con componentes aniónicos de la membrana plasmática y penetra al interior de la célula, posiblemente formando poros transitorios, que, debido a su rápida desintegración, no implican cambios drásticos en el potencial de la membrana plasmática ni alteraciones en la permeabilidad de la misma. Posteriormente, el péptido interactúa con componentes de las membranas de algunos organelos como la cardiolipina en la mitocondria. La interacción con la mitocondria induce la producción de ROS y liberación de endonucleasas como AIF o Endo G, relacionadas con apoptosis independiente de caspasas, que comienzan la degradación del DNA. Al adicionar el butirato, éste ingresa al interior de las células, se acumula en el núcleo y actúa inhibiendo HDAC para modificar la expresión de genes de la familia Bcl. El incremento en la expresión de Bid, promueve la desestabilización de la membrana mitocondrial, y promueve el incremento en las ROS, este incremento acelera la desestabilización mitocondrial y la liberación de los componentes proapoptogénicos e induce daño al DNA. Al detectarse daño al DNA

inducido por las ROS se incrementa la expresión del inhibidor p21 y de la ciclina D1 y disminuye la expresión de Cdk2 y ciclina E, lo que produce el arresto en la fase G1 del ciclo celular. La disminución en la expresión de Bcl-xL e incremento en la expresión de Bak también contribuyen a la liberación del citocromo c, y posterior formación del apoptosoma para activar a la caspasa 9. Se incrementa la expresión de la expresión de receptores de muerte como Fas que activan a la caspasa 8 contribuyendo ambas caspasas activas a desencadenar la apoptosis.

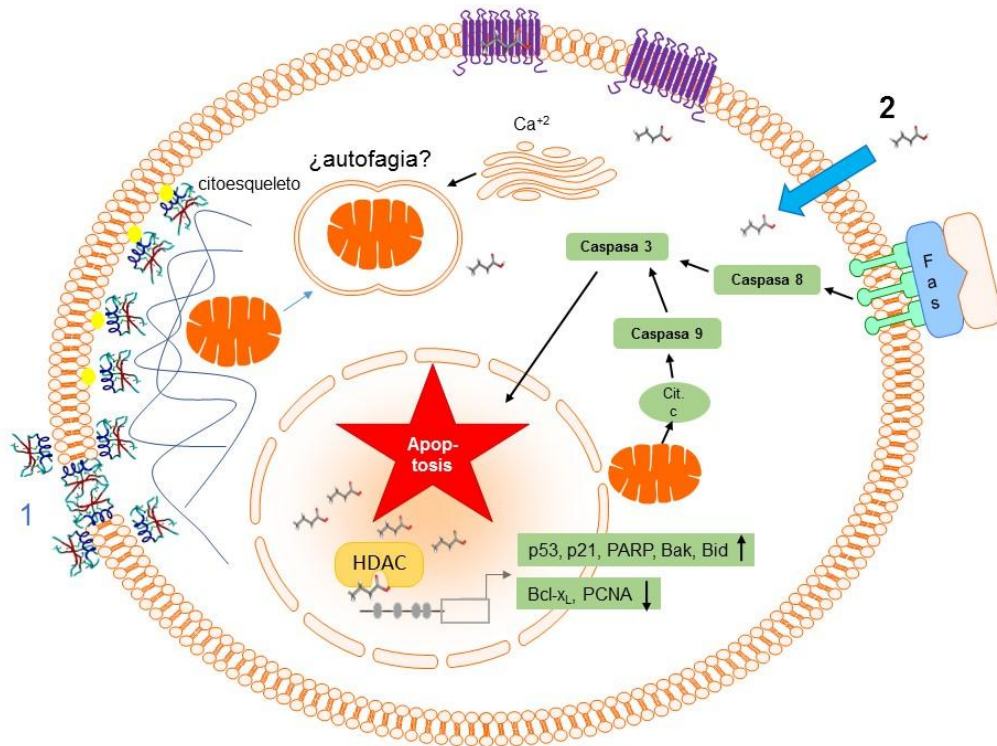


Figura 9. Modelo del mecanismo de acción de la actividad conjunta de γ -tionina y butirato en las células HCT116.

Primero se adiciona el AMP γ -tionina. Este interactúa con componentes aniónicos de la membrana plasmática y penetra al interior de la célula, posiblemente formando poros transitorios, no implican cambios drásticos en el potencial de la membrana plasmática ni alteraciones en la permeabilidad de la misma. Posteriormente, el péptido interactúa con componentes de la capa interna de la membrana celular como los fosfatidil inositoles “secuestrándolos” e interfiriendo con la interacción citoesqueleto-membrana, y favoreciendo la formación de los autofagosomas. Al adicionar el butirato, éste ingresa al interior de las células, se acumula en el núcleo y actúa inhibiendo HDAC para modificar la expresión de genes. Incrementa la expresión de p53, p21, PARP y Bak, y disminuye la de Bcl-xL y PCNA. La disminución en la expresión de Bcl-xL e incremento en la expresión de Bak contribuyen a la liberación del citocromo c, y posterior formación del apoptosoma para activar a la caspasa 9. Se incrementa la expresión de la expresión de receptores de muerte como Fas que activan a la caspasa 8 contribuyendo ambas caspasas activas a desencadenar la apoptosis. El butirato incrementa la autofagia al inducir estrés del retículo endoplásmico, por lo que la autofagia contribuye al incremento en la muerte celular observado con la combinación.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

El pretratamiento con el péptido antimicrobiano γ -tionina incrementa el efecto citotóxico del butirato a través de un efecto aditivo, induciendo diferentes mecanismos de muerte en células de cáncer de colon con fondo genético distinto.

10. REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

1. Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull.* 2002;64(1):27–43.
2. Sever R, Brugge JS. Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Apr 1;5(4):a006098–a006098.
3. Koorey DJ, McCaughan GW. Tumour suppressor genes and colorectal neoplasia. *J Gastroenterol Hepatol.* 1993 Apr;8(2):174–84.
4. Levine AJ. The Tumor Suppressor Genes. *Annu Rev Biochem.* 1993;62(1):623–51.
5. Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(1):35–42.
6. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jan;5(1):37–50.
7. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2012 Apr;81(4):303–11.
8. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286–98.
9. Lee C-C, Lin Y-H, Chang W-H, Lin P-C, Wu Y-C, Chang J-G. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer.* 2011;11(1):58.
10. Christofori G. Cancer: Division of labour. *Nature.* 2007 Apr 12;446(7137):735–6.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011 Mar;144(5):646–74.
12. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1117–34.
13. Zhu L, Lu Z, Zhao H. Antitumor mechanisms when pRb and p53 are genetically inactivated. *Oncogene.* 2015 Aug 27;34(35):4547–57.
14. Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006 Aug 7;25(34):4798–811.
15. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):453–458.

16. Sun W. Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2012;5:63.
17. Agrawal A, Dang S, Gabrani R. Recent Patents on Anti-Telomerase Cancer Therapy. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. 2012 Jan 1;7(1):102–17.
18. Kim J. Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Res*. 2006 Sep 15;66(18):8927–30.
19. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jan;6(1):24–37.
20. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers S, *et al*. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
21. May M. Statistics: Attacking an epidemic. *Nature*. 2014 May 29;509(7502):S50–1.
22. WHO. Cancer. Fact sheet N°297 [Internet]. 2015 [cited 2016 Oct 15]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
23. Bingham SA. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans*. 2000 Feb;28(2):12–6.
24. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar 1;61(2):69–90.
25. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al*. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
26. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de Febrero) [Internet]. 2014 [cited 2014 May 9]. Available from: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
27. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759–67.
28. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997 Oct;21(5):233–300.
29. Tejpar S, Cutsem EV. Molecular and genetic defects in colorectal tumorigenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002 Apr;16(2):171–85.
30. Schneikert J, Behrens J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut*. 2007 Mar 1;56(3):417–25.

31. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr 1;10(7):721–33.
32. Vincenzi B, Cremolini C, Sartore-Bianchi A, Russo A, Mannavola F, Perrone G, *et al.* Prognostic significance of K-Ras mutation rate in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget.* 2015 Oct 13;6(31):31604–12.
33. Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, Sammalkorpi H, Järvinen H, Mecklin J-P, *et al.* SMAD4 as a Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Apr 1;11(7):2606–11.
34. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, *et al.* Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(14):9433–9438.
35. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):55–67.
36. Ponz de Leon M, Percesepe A. Pathogenesis of colorectal cancer. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver.* 2000 Dec;32(9):807–21.
37. Bae JM, Kim JH, Kang GH. Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and Their Clinicopathologic Features, With an Emphasis on the Serrated Neoplasia Pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(5):406–412.
38. Burbano Luna DF, Manrique MA, Chávez García MÁ, Pérez Corona T, Hernández Velázquez NN, Escandón Espinoza YM, *et al.* Epidemiología del cáncer colorrectal en menores de 50 años en el Hospital Juárez de México. *Endoscopia.* 2016 Oct;28(4):160–5.
39. Hagland HR, Søreide K. Cellular metabolism in colorectal carcinogenesis: Influence of lifestyle, gut microbiome and metabolic pathways. *Cancer Lett.* 2015 Jan;356(2):273–80.
40. Cooper K, Squires H, Carroll C, Papaioannou D, Booth A, Logan R, *et al.* Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2010 Jun;14(32).
41. Mitchell EP. Targeted therapy for metastatic colorectal cancer: role of aflibercept. *Clin Colorectal Cancer.* 2013 Jun;12(2):73–85.
42. Cermak K, Thill V, Simoens CH, Smets D, Ngongang CH, da Costa PM. Surgical resection for colon cancer: laparoscopic assisted vs. open colectomy. *Hepatogastroenterology.* 2008 Apr;55(82–83):412–7.
43. Asmis TR, Saltz L. Systemic Therapy for Colon Cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2008 Mar;37(1):287–95.

44. Robertson JM. The Role of Radiation Therapy for Colorectal Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):269–85.
45. Chen C, Sun P, Rong J, Weng H-W, Dai Q, Ye S. Short Course Radiation in the Treatment of Localized Rectal cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2015 Jun 9];5.
46. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, *et al*. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22;351(4):337–45.
47. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, *et al*. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 Jan 15;22(2):229–37.
48. Prenen H, Vecchione L, Cutsem EV. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol*. 2013 May 5;8(2):83–96.
49. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, *et al*. Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin (FOLFOX4) for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer: Results From the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007 Apr 20;25(12):1539–44.
50. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, *et al*. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer*. 2011 Jul 1;129(1):245–55.
51. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol*. 2016 Jan;8(1):57–84.
52. Fakih MG, Fetterly G, Egorin MJ, Muindi JR, Espinoza-Delgado I, Zwiebel JA, *et al*. A phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of two schedules of vorinostat in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Jul 15;16(14):3786–94.
53. Reid T, Fisher G, Carter C, Cho-Phan C, Kunz P, Oronsky B, *et al*. RRx-001, a novel epigenetic modulator: Resensitization to previously failed therapy in the ongoing phase 2 colorectal cancer study, ROCKET. *Cancer Res*. 2016 Jan 15;76(2 Supplement):B26–B26.
54. Marshall JR. Prevention of Colorectal Cancer: Diet, Chemoprevention, and Lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):73–82.

55. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Dec;16(6):663–9.
56. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 May 20;16(6):329–44.
57. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, et al. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013 Feb;61(1):43–58.
58. Amaravadi RK, Thompson CB. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 15;13(24):7271–9.
59. Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol Cell.* 2002 Mar 1;9(3):459–70.
60. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010 Mar 15;48(6):749–62.
61. Croce CM, Reed JC. Finally, An Apoptosis-Targeting Therapeutic for Cancer. *Cancer Res.* 2016 Sep 30.
62. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2785–96.
63. Millan A, Huerta S. Apoptosis-Inducing Factor and Colon Cancer. *J Surg Res.* 2009 Jan;151(1):163–70.
64. Zhang L, Yu J. Role of Apoptosis in Colon Cancer Biology, Therapy, and Prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2013 Dec;9(4):331–40.
65. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazzon M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* 2004 Aug 1;5(8):825–30.
66. Kang R, Zhang Q, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both? *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013 Aug 1;19(15):4046–57.
67. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep;5(9):726–34.
68. Macintosh RL, Ryan KM. Autophagy in tumour cell death. *Semin Cancer Biol.* 2013 Oct;23(5):344–51.

69. Gill RK, Dudeja PK. A novel facet to consider for the effects of butyrate on its target cells. Focus on “The short-chain fatty acid butyrate is a substrate of breast cancer resistance protein.” *AJP Cell Physiol*. 2011 Nov 1;301(5):C977–9.
70. Zeng H. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention. *World J Gastrointest Oncol*. 2014;6(2):41.
71. Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006 Mar;40(3):235–43.
72. Sun Y, O’Riordan MXD. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier; 2013. p. 93–118.
73. Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2010 Nov;1801(11):1175–83.
74. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients*. 2011 Oct 14;3(12):858–76.
75. Lin HV, Frassetto A, Kowalik Jr EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, *et al*. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS ONE*. 2012 Apr 10;7(4).
76. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J. The role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Oct 26;27(2):104–19.
77. Bultman SJ. Molecular Pathways: Gene-Environment Interactions Regulating Dietary Fiber Induction of Proliferation and Apoptosis via Butyrate for Cancer Prevention. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):799–803.
78. Wächtershäuser A, Loitsch SM, Stein J. PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 7;272(2):380–5.
79. Yin L. Butyrate Suppression of Colonocyte NF-kappa B Activation and Cellular Proteasome Activity. *J Biol Chem*. 2001 Nov 21;276(48):44641–6.
80. Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, *et al*. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-

transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis*. 2005 Jun;26(6):1064–76.

81. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol Cell*. 2012 Nov;48(4):612–26.

82. Daly K, Cuff MA, Fung F, Shirazi-Beechey SP. The importance of colonic butyrate transport to the regulation of genes associated with colonic tissue homeostasis. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(4):733–736.

83. Cassidy A, Bingham SA, Cummings JH. Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer*. 1994 May;69(5):937–42.

84. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, *et al*. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet Lond Engl*. 2003 May 3;361(9368):1496–501.

85. Murphy N, Norat T, Ferrari P, Jenab M, Bueno-de-Mesquita B, Skeie G, *et al*. Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *PloS One*. 2012;7(6):e39361.

86. Clausen MR, Bonnén H, Mortensen PB. Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. *Gut*. 1991 Aug;32(8):923–8.

87. Wang T, Cai G, Qiu Y, Fei N, Zhang M, Pang X, *et al*. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*. 2012 Feb;6(2):320–9.

88. Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011 May;12(5):504–12.

89. Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J Nutr*. 2002;132(7):1812–1818.

90. Kim J, Park H, Im JY, Choi WS, KIM HS. Sodium butyrate regulates androgen receptor expression and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Anticancer Res*. 2007;27(5A):3285–3292.

91. Tailor D, Hahm E-R, Kale RK, Singh SV, Singh RP. Sodium butyrate induces DRP1-mediated mitochondrial fusion and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mitochondrion*. 2014 May;16:55–64.

92. Xiao M, Liu YG, Zou MC, Zou F. Sodium butyrate induces apoptosis of human colon cancer cells by modulating ERK and sphingosine kinase 2. *Biomed Environ Sci BES*. 2014 Mar;27(3):197–203.
93. Canani RB. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2011;17(12):1519.
94. Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*. 1998 Feb;16(2):82–8.
95. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*. 2011 Sep;29(9):464–72.
96. Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012 Oct;37(2):207–15.
97. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*. 2010 Apr;135(1):1–11.
98. Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J*. 2009 Nov;276(22):6483–96.
99. Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(suppl 1):D590–2.
100. Mansour SC, Pena OM, Hancock REW. Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol*. 2014 Sep;35(9):443–50.
101. Padovan L, Scocchi M, Tossi A. Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci*. 2010;11(3):210–219.
102. Tam J, Wang S, Wong K, Tan W. Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals*. 2015 Nov 16;8(4):711–57.
103. Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol*. 1995;108(4):1353.
104. Lacerda AF, Vasconcelos ÉAR, Pelegrini PB, Grossi de Sa MF. Antifungal defensins and their role in plant defense. *Front Microbiol*. 2014 Apr 2;5.
105. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol*. 2013;4.

106. Guzmán-Rodríguez JJ, Ochoa-Zarzosa A, López-Gómez R, López-Meza JE. Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1–11.
107. Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006 Aug;15(8):933–46.
108. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2008 Feb;1778(2):357–75.
109. Evans J, Wang YD, Shaw KP, Vernon LP. Cellular responses to Pyrularia thionin are mediated by Ca²⁺ influx and phospholipase A2 activation and are inhibited by thionin tyrosine iodination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug;86(15):5849–53.
110. Suttman H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, *et al.* Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol.* 2008 Mar 3;8:5.
111. Wu D, Gao Y, Qi Y, Chen L, Ma Y, Li Y. Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 2014 Aug;351(1):13–22.
112. Mader JS, Salsman J, Conrad DM, Hoskin DW. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(4):612–624.
113. Yoo YC, Watanabe S, Watanabe R, Hata K, Shimazaki K, Azuma I. Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn J Cancer Res Gann.* 1997 Feb;88(2):184–90.
114. Li S-S, Gullbo J, Lindholm P, Larsson R, Thunberg E, Samuelsson G, *et al.* Ligatoxin B, a new cytotoxic protein with a novel helix-turn-helix DNA-binding domain from the mistletoe *Phoradendron liga*. *Biochem J.* 2002 Sep 1;366(Pt 2):405–13.
115. Ren SX, Shen J, Cheng ASL, Lu L, Chan RLY, Li ZJ, *et al.* FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells. Nie D, editor. *PLoS ONE.* 2013 May 20;8(5):e63641.
116. Mei H, Jin X, Zhu J, Zeng A, Wu Q, Lu X, *et al.* β -defensin 2 as an Adjuvant Promotes Anti-Melanoma Immune Responses and Inhibits the Growth of Implanted Murine Melanoma In Vivo. *PLoS ONE.* 2012 Feb 13;7(2).

117. Al-Rayahi IAM, Sanyi RHH. The Overlapping Roles of Antimicrobial Peptides and Complement in Recruitment and Activation of Tumor-Associated Inflammatory Cells. *Front Immunol*. 2015 Jan 22;6.
118. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Oct 1;169(7):3883–91.
119. Chernysh S, Irina K, Irina A. Anti-tumor activity of immunomodulatory peptide alloferon-1 in mouse tumor transplantation model. *Int Immunopharmacol*. 2012 Jan;12(1):312–4.
120. Ngai PHK, Ng TB. Coccinin, an antifungal peptide with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from large scarlet runner beans. *Peptides*. 2004 Dec;25(12):2063–8.
121. Ngai PHK, Ng TB. Phaseococcin, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. 2005 Apr;83(2):212–20.
122. Lin P, Wong JH, Ng TB. A defensin with highly potent antipathogenic activities from the seeds of purple pole bean. *Biosci Rep*. 2009 Nov 10;30(2):101–9.
123. Poon IK, Baxter AA, Lay FT, Mills GD, Adda CG, Payne JA, *et al*. Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *Elife*. 2014;3:e01808.
124. Baxter AA, Richter V, Lay FT, Poon IKH, Adda CG, Veneer PK, *et al*. The Tomato Defensin TPP3 Binds Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate via a Conserved Dimeric Cationic Grip Conformation To Mediate Cell Lysis. *Mol Cell Biol*. 2015 Jun 1;35(11):1964–78.
125. Guzmán-Rodríguez JJ, López-Gómez R, Salgado-Garciglia R, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomed Pharmacother*. 2016 Aug;82:620–7.
126. Guzmán-Rodríguez JJ. Citotoxicidad de las Defensinas γ -tionina (*Capsicum chinense*) y PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) Contra Líneas Celulares Cancerosas. Tesis Doctoral, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2016.
127. Teicher BA. Combinations of PARP, hedgehog and HDAC inhibitors with standard drugs. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Aug;10(4):397–404.

128. Miller CP, Singh MM, Rivera-Del Valle N, Manton CA, Chandra J. Therapeutic Strategies to Enhance the Anticancer Efficacy of Histone Deacetylase Inhibitors. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–17.
129. Gore SD, Carducci MA. Modifying histones to tame cancer: clinical development of sodium phenylbutyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000 Dec;9(12):2923–34.
130. Rahmani M. The Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate Interacts Synergistically with Phorbol Myristate Acetate (PMA) to Induce Mitochondrial Damage and Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells through a Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Process. *Exp Cell Res.* 2002 Jul 1;277(1):31–47.
131. Pei X-Y, Dai Y, Grant S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3839–3852.
132. Pajak B, Orzechowski A, Gajkowska B. Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci Gruyter.* 2007;52
133. Jones SA, Butler RN, Sanderson IR, Wilson JW. The effect of specific caspase inhibitors on TNF- α and butyrate-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2004 Jan;292(1):29–39.
134. Kiefer J, Beyer-Sehlmeyer G, Pool-Zobel BL. Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells. *Br J Nutr.* 2006 Nov;96(5).
135. Kolar SSN, Barhoumi R, Lupton JR, Chapkin RS. Docosahexaenoic Acid and Butyrate Synergistically Induce Colonocyte Apoptosis by Enhancing Mitochondrial Ca²⁺ Accumulation. *Cancer Res.* 2007 Jun 1;67(11):5561–8.
136. Cho HJ, Kim SY, Kim KH, Kang WK, Kim JI, Oh ST, *et al.* The combination effect of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on radiosensitivity in RKO colorectal cancer and MCF-7 breast cancer cell lines. *World J Surg Oncol.* 2009;7:49.
137. Saldanha SN, Kala R, Tollefsbol TO. Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate. *Exp Cell Res.* 2014 May;324(1):40–53.
138. Gospodinov A, Popova S, Vassileva I, Anachkova B. The Inhibitor of Histone Deacetylases Sodium Butyrate Enhances the Cytotoxicity of Mitomycin C. *Mol Cancer Ther.* 2012 Oct 1;11(10):2116–26.

139. Schwab M, Reynders V, Steinhilber D, Stein J. Combined treatment of Caco-2 cells with butyrate and mesalazine inhibits cell proliferation and reduces Survivin protein level. *Cancer Lett.* 2009 Jan;273(1):98–106.
140. Zhao J, Huang Y, Liu D, Chen Y. Two hits are better than one: Synergistic anticancer activity of α -helical peptides and doxorubicin/epirubicin. *Oncotarget.* 2015;6(3):1769–1778.
141. Shi S-L, Wang Y-Y, Liang Y, Li Q-F. Effects of tachyplesin and n-sodium butyrate on proliferation and gene expression of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823. *World J Gastroenterol* 2006 March 21; 12(11): 1694-1698
142. Anaya-López José Luis. Actividad antifúngica y citotóxica de la defensina γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) producida por células endoteliales bovinas Tesis Doctoral: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2006.
143. Anaya-López JL, López-Meza JE, Baizabal-Aguirre VM, Cano-Camacho H, Ochoa-Zarzosa A. Fungicidal and Cytotoxic Activity of a *Capsicum chinense* Defensin Expressed by Endothelial Cells. *Biotechnol Lett.* 2006 Jul;28(14):1101–8.
144. Díaz-Murillo V, Medina-Estrada I, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides.* 2016 Apr;78:109–18.
145. Gravit L. Therapy: This time it's personal. *Nature.* 2014;509(7502):S52–S54.
146. Salas CE, Badillo-Corona JA, Ramírez-Sotelo G, Oliver-Salvador C. Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1–11.
147. Wu D, Gao Y, Qi Y, Chen L, Ma Y, Li Y. Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 2014 Aug;351(1):13–22.
148. Risso A, Braidot E, Sordano MC, Vianello A, Macri F, Skerlavaj B, *et al.* BMAP-28, an Antibiotic Peptide of Innate Immunity, Induces Cell Death through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell Biol.* 2002 Mar 15;22(6):1926–35.
149. Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol.* 2009 Dec;625(1–3):190–4.
150. Berni Canani R, Di Costanzo M, Leone L. The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin Epigenetics.* 2012 Feb 27;4(1):4.

151. Pino MS, Kikuchi H, Zeng M, Herraiz M, Sperduti I, Berger D, *et al.* Epithelial to Mesenchymal Transition Is Impaired in Colon Cancer Cells With Microsatellite Instability. *Gastroenterology*. 2010 Apr;138(4):1406–17.
152. Kim MJ, Cho YB, Chun H-K, Lee WY, Yun SH, Kim HC. The expression of epithelial mesenchymal transition related factors in human colorectal cancer cell lines. *Korean J Clin Oncol*. 2013 Dec 30;9(2):160–7.
153. Roepman P, Schlicker A, Tabernero J, Majewski I, Tian S, Moreno V, *et al.* Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition: Molecular subtypes in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2014 Feb 1;134(3):552–62.
154. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Feb 23;107(8):3722–7.
155. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jul;9(7):489–99.
156. Schell MJ, Yang M, Teer JK, Lo FY, Madan A, Coppola D, *et al.* A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nat Commun*. 2016 Jun 15;7:11743.
157. Wilson AJ, Chueh AC, Togel L, Corner GA, Ahmed N, Goel S, *et al.* Apoptotic Sensitivity of Colon Cancer Cells to Histone Deacetylase Inhibitors Is Mediated by an Sp1/Sp3-Activated Transcriptional Program Involving Immediate-Early Gene Induction. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):609–20.
158. Joseph J, Wajapeyee N, Somasundaram K. Role of p53 status in chemosensitivity determination of cancer cells against histone deacetylase inhibitor sodium butyrate. *Int J Cancer*. 2005 May 20;115(1):11–8.
159. Lazarova DL, Bordonaro M, Carbone R, Sartorelli AC. Linear relationship between Wnt activity levels and apoptosis in colorectal carcinoma cells exposed to butyrate. *Int J Cancer*. 2004 Jul 1;110(4):523–31.
160. Lemieux E, Cagnol S, Beaudry K, Carrier J, Rivard N. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene*. 2015 Sep 17;34(38):4914–27.
161. Hancock REW, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol*. 2016 May;16(5):321–34.

162. Silva ON, Porto WF, Migliolo L, Mandal SM, Gomes DG, Holanda HHS, et al. Cn-AMP1: A new promiscuous peptide with potential for microbial infections treatment. *Biopolymers*. 2012;98(4):322–31.
163. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res*. 2013 Oct;52(4):590–614.
164. Millan A, Huerta S. Apoptosis-Inducing Factor and Colon Cancer. *J Surg Res*. 2009 Jan;151(1):163–70.
165. Cerón JM, Contreras-Moreno J, Puertollano E, de Cienfuegos GÁ, Puertollano MA, de Pablo MA. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Peptides*. 2010 Aug;31(8):1494–503.