



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

TESIS

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN LA HISTONA 3 ASOCIADAS AL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS γ -TIONINA Y PaDef EN LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA

QUE PRESENTA:

M.C. PAOLA JIMÉNEZ ALCÁNTAR

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN: BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

DIRECTORA:

D.C. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

CO-DIRECTOR:

D.C. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA



MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE 2022

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

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (proyecto 14.1) y del CONACYT (proyecto CB 2016-287210 y beca 715504).

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie

DEDICATORIA:

A mi compañero de vida y aventuras, Damián Nodarse Alfaro, que impulsa siempre mis sueños y proyectos.

A mis padres, Ma. de la Luz Alcántar Correa y Eduardo Jiménez Rueda, que siempre han sido mi sustento y sin ellos no habría llegado hasta aquí.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, porque todo el amor, apoyo y empuje que me han dado me ha impulsado a llegar hasta este momento, ¡Gracias!.

Damián Nodarse Alfaro, gracias por estar en los momentos buenos y malos, por apoyarme en mi crecimiento personal y crecer conmigo siempre. Te amo.

A mis asesores, Alejandra Ochoa Zarzosa y Joel Edmundo López Meza, les agradezco por cuatro años de aprendizaje y crecimiento profesional, porque más allá de las dificultades siempre creyeron en mí.

A los miembros de mi comité sinodal, Ma. de la Luz Torner Aguilar, Jesús Campos García y Ana Laura Pereira Suárez, les agradezco por todas sus aportaciones a mi trabajo y a mi crecimiento como profesional.

A mis amigas del laboratorio, Araceli, Andrea, Inés y Lili, porque sin ustedes el trabajo en el laboratorio no hubiera sido el mismo, por las pláticas, por las risas, por los consejos y por compartir su conocimiento conmigo, gracias.

Finalmente, agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, mi alma mater, y a CONACYT, por la oportunidad de crecimiento profesional que me ha brindado el hacer un doctorado.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Cáncer.....	3
1.1.1. Cáncer hematológico.....	6
1.1.1.1. Leucemia.....	6
1.1.1.1.1. Definición y epidemiología.....	6
1.1.1.1.2. Clasificación y diagnóstico.....	7
1.1.1.1.3. Factores de riesgo.....	12
1.1.1.1.4. Etiología.....	13
1.1.1.1.4.1. Mutaciones cromosómicas.....	14
1.1.1.1.4.2. Mutaciones genéticas (puntuales).....	15
1.1.1.1.4.3. Alteraciones epigenéticas.....	17
1.1.1.1.5. Tratamiento.....	21
1.2. Péptidos antimicrobianos.....	26
1.2.1. Características y estructura.....	26
1.2.2. Mecanismo de acción.....	27
1.3. Péptidos antimicrobianos de plantas.....	29
1.3.1. Defensinas de plantas.....	30
1.3.1.1. Características y estructura.....	30
1.3.1.2. Clasificación.....	32
1.3.1.3. Actividad biológica y citotóxica.....	33
1.4. Apoptosis.....	34
1.4.1. Definición y características.....	34
1.4.2. Etapas de la apoptosis.....	35
1.4.3. Vías de inducción de la apoptosis.....	36
1.4.3.1. Vía de receptores de muerte o vía extrínseca.....	36
1.4.3.2. Vía mitocondrial o intrínseca.....	38
1.4.3.3. Efectores de apoptosis.....	38

1.4.4.	La apoptosis y el cáncer.....	40
2.	ANTECEDENTES	41
3.	JUSTIFICACIÓN.....	42
4.	HIPÓTESIS	44
5.	OBJETIVO GENERAL	44
5.1.	Objetivos específicos.....	44
6.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	45
7.	RESULTADOS	46
7.1.	CAPÍTULO 1. PaDef (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>), a plant antimicrobial peptide, triggers apoptosis and induces global epigenetic modifications on histone 3 in an acute lymphoid leukemia cell line.	47
7.2.	CAPÍTULO 2. The cytotoxic effect of the antimicrobial peptide γ -thionin (<i>Capsicum chinense</i>) is associated with global epigenetic modifications in histone 3 in a chronic myeloid leukemia line and acute lymphoid leukemia.	66
7.3.	CHAPTER 3. Obesidad: ¿Cómo afecta nuestra salud lo que mamá comió durante el embarazo?	83
8.	DISCUSIÓN GENERAL	87
9.	CONCLUSIÓN GENERAL.....	91
10.	REFERENCIAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características distintivas del cáncer.....	5
Figura 2. Clasificación FAB para la leucemia linfoblástica aguda.....	8
Figura 3. Clasificación FAB para la leucemia mieloblástica aguda.....	9
Figura 4. Nicho de la médula ósea.....	14
Figura 5. Representación de las mutaciones cromosómicas.....	15
Figura 6. Modelo de la evolución preleucémica a leucemia.....	16
Figura 7. Enzimas epigenéticas responsables de las modificaciones de histonas.....	19
Figura 8. Representación de la clasificación de los AMPs según su estructura secundaria..	29
Figura 9. Mecanismo de acción permeabilizante y no permeabilizante sobre la membrana celular de AMPs.....	33
Figura 10. Clasificación de las defensinas de acuerdo a su estructura secundaria.....	31
Figura 11. Representación esquemática de las defensinas de plantas.....	32
Figura 12. Clases de defensinas de plantas.....	33
Figura 13. Etapas de la apoptosis.....	36
Figura 14. Vías de inducción de apoptosis.....	37
Figura 15. Miembros de la familia Bcl-2.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de la OMS para las neoplasias hematológicas.....	10
Tabla 2. Factores de riesgo asociados al desarrollo de leucemias.....	13
Tabla 3. Fármacos epigenéticos aprobados por la FDA.....	25
Tabla 4. Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Act-D	Actinomicina D	LLT	Leucemia linfoblástica T
AIF	Factor inductor de apoptosis	LLC	Leucemia linfocítica crónica
AMP	Péptido antimicrobiano	LMA	Leucemia mieloblástica aguda
ATCC	Colección Americana de cultivos	LMC	Leucemia mielocítica crónica
CAR	Receptor de antígeno quimérico	mRNA	RNA mensajero
CMH	Células madre hematopoyéticas	miRNA	Micro RNA
DMSO	Dimetil sulfóxido	MTT	Colorante bromuro de 3-(4,5 - dimetiltiazol -2-il)-2,5- difeniltetrazolio
DNA	Ácido desoxirribonucleico	NaB	Butirato de sodio
DNMT	DNA metiltransferasa	NK	Natural killer
DTT	Ditiotreitól	OMS	Organización mundial de la salud
FAB	Franco Americano Británica	RE	Retículo endoplasmático
FBS	Suero fetal bovino	RNA	Ácido ribonucleico
FDA	Administración de alimentos y fármaco	ROS	Especies reactivas de oxígeno
HAT	Histona acetil transferasa	SAHA	Ácido hidroxámico suberoilánilida
HDAC	Histona desacetilasa	SE	Error estándar
HDM	Histona desmetilasa	SMAC	Pequeño activador de caspasas derivado de mitocondrias
HMC	Complejo mayor de histocompatibilidad	TKI	Inhibidor de tirosina quinasa
HMT	Histona metiltransferasa	TNF	Factor de necrosis tumoral
IAP	Pequeño activador de caspasas	TNFR	Receptor de factor de necrosis tumoral
IARC	Agencia internacional para la investigación del cáncer	TNM	Metastasis de nódulo tumoral
iEZH2	Inhibidor de histona lisina metiltransferasa	TSA	Tricostatina
iHDAC	Inhibidor de Histona desacetilasa		
iDNMT	Inhibidor de DNA metiltransferasa		
KDM	Lisina desmetilasa		
LLA	Leucemia linfoblástica aguda		
LLB	Leucemia linfoblástica B		

RESUMEN

La leucemia, es una de las enfermedades con más relevancia en el desarrollo de nuevas terapias con enfoque epigenético. El uso combinado de la terapia epigenética y quimioterapia ha logrado sinergizar los efectos de la quimioterapia, y disminuir la resistencia a los tratamientos. Sin embargo, aún se desconocen todos los mecanismos de acción de los fármacos epigenéticos, sus efectos a largo alcance y su toxicidad puede ser equiparable a la de la quimioterapia, por lo que la búsqueda de terapias alternativas sigue siendo una prioridad. En ese sentido, los péptidos antimicrobianos de plantas representan una atractiva alternativa debido a su actividad citotóxica en células cancerosas. En este trabajo se evaluó la citotoxicidad del péptido PaDef, de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en la línea de leucemia Jurkat, se determinó su mecanismo de acción y la relación de su citotoxicidad con modificaciones epigenéticas. PaDef ($IC_{50}=47.3\mu M$) indujo la muerte celular a través de apoptosis dependiente de las caspasas e incrementó la expresión de genes proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bax y Bik); incrementó la producción de ROS y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Interesantemente, la inhibición de las caspasas no revirtió el efecto, sugiriendo que existen otros mecanismos de muerte independientes de caspasas. Por otro lado, PaDef incrementó la acetilación global de la histona 3 y la marca H3K9Ac. Este efecto correlacionó con una reducción en la actividad de HDACs. Un análisis *in silico* mostró que PaDef interactúa con HDACs de clase I con energías libres de afinidad superiores a los inhibidores reportados (TSA, NaB). Además, PaDef aumentó las marcas de H3K9me2 y H3K9me3. Por otro lado, el efecto citotóxico de la defensina γ -tionina en las líneas celulares K-562 y Jurkat (Flores-Álvarez, 2018), se asocia también a modificaciones epigenéticas. Se observaron incrementos en las marcas de acetilación global, H3K9Ac, H3K9me2 y H3K9me3. En conjunto, los resultados sugieren que el efecto citotóxico de γ -tionina y PaDef están asociados a la modulación epigenética de la Histona 3. Estos son los primeros reportes de defensinas de plantas con actividad epigenética relacionada al efecto citotóxico en células de leucemia.

Palabras clave: Leucemia, apoptosis, epigenética, defensinas, péptidos antimicrobianos

ABSTRACT

Leukemia is one of the most relevant diseases in the development of new therapies with an epigenetic approach. The combined use of epigenetic therapy and chemotherapy has managed to synergize the effects of chemotherapy and reduce resistance to treatments. However, the mechanisms of action of epigenetic drugs, their long-range effects and their toxicity may be comparable to that of chemotherapy are still unknown, so the search for alternative therapies continues to be a priority. In that sense, plant antimicrobial peptides represent an attractive alternative due to their cytotoxic activity in cancer cells. In this work, the cytotoxicity of the PaDef peptide from native Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) was evaluated in the Jurkat leukemia line, its mechanism of action and the relationship of its cytotoxicity with epigenetic modifications were determined. PaDef (IC₅₀=47.3 μ M) induced cell death through caspase-dependent apoptosis and increased the expression of proapoptotic genes of the Bcl-2 family (Bax and Bik); it increased ROS production and loss of mitochondrial membrane potential. Interestingly, inhibition of caspases did not reverse the effect, suggesting that other caspase-independent death mechanisms exist. On the other hand, PaDef increased global histone 3 acetylation and the H3K9Ac mark. This effect correlated with a reduction in HDACs activity. An in silico analysis showed that PaDef interacts with class I HDACs with higher affinity free energies than reported inhibitors (TSA, NaB). In addition, PaDef increased H3K9me2 and H3K9me3 labeling. On the other hand, the cytotoxic effect of γ -thionine defensin in K-562 and Jurkat cell lines (Flores-Alvarez, 2018), is also associated with epigenetic modifications. Increases in global acetylation marks, H3K9Ac, H3K9me2 and H3K9me3 were observed. Taken together, the results suggest that the cytotoxic effect of γ -thionine and PaDef are associated with epigenetic modulation of Histone 3. These are the first reports of plant defensins with epigenetic activity related to cytotoxic effect in leukemia cells.

Keywords: leukemia, apoptosis, epigenetics, defensins, antimicrobial peptides.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

En el año 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que el cáncer representó la primera o segunda causa de muerte para personas menores de 70 años en 112 de los 183 países. Además, se estima que 1 de cada 5 personas desarrollará cáncer durante su vida. Por otro lado, en el año 2020, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, International Agency for Research on Cancer) reportó 19.3 millones de casos de cáncer a nivel mundial y 10 millones de defunciones por esta causa (Sung *et al.*, 2021), y se prevé que para el año 2040 se produzcan alrededor de 28.4 millones de nuevos casos de cáncer. Esto representa un incremento del 47% con respecto al reporte del año 2020, suponiendo que las tasas nacionales estimadas se mantengan constantes. Los principales factores que impulsan el incremento de casos por año son: el envejecimiento de la población, una mayor prevalencia de factores de riesgo y los factores socioeconómicos (Sung *et al.*, 2021).

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una proliferación descontrolada de las células y se puede presentar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo (OMS). El desarrollo de esta enfermedad surge de la acumulación de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que le permiten a las células sobrevivir, proliferar e invadir zonas adyacentes (Graham & Sottoriva, 2017).

De manera más específica, se han descrito diversas características distintivas del desarrollo y mantenimiento de esta enfermedad (Fig. 1):

- 1) Mantener la señalización proliferativa, las células cancerosas tienen exacerbada la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento y la proliferación.
- 2) Evadir los supresores de tumores, que comprenden moléculas que regulan negativamente la proliferación celular, su evasión permite a las células cancerosas mantener el estado proliferativo.
- 3) Resistir a la muerte celular, las células cancerosas desarrollan estrategias para limitar o evadir la muerte.

- 4) Inmortalidad replicativa, las células cancerosas deben superar la senescencia celular que las lleve a frenar la replicación y finalmente las conduzca a la muerte.
- 5) Inducción de angiogénesis, las señales proangiogénicas aberrantes en las células cancerosas aportan el sustento de nutrientes y oxígeno que requiere el ambiente tumoral.
- 6) Activar la invasión y metástasis.
- 7) Reprogramación del metabolismo energético, que les permita respaldar la demanda de mayor energía para el crecimiento y proliferación continuas y algunas otras características neoplásicas.
- 8) Evasión de la destrucción de células cancerosas por parte del sistema inmune, al deshabilitar los componentes del sistema inmune para ser eliminadas.
- 9) Inestabilidad y mutación del genoma, que son clave para el inicio y desarrollo del cáncer.
- 10) Inflamación, un ambiente proinflamatorio en el tumor puede suministrar moléculas bioactivas que favorezcan el crecimiento y mantenimiento del tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por otro lado, el avance en el conocimiento de esta enfermedad ha permitido proponer algunas otras características como parte del desarrollo y mantenimiento de la enfermedad:

- 11) Desbloqueo de la plasticidad fenotípica, esto indica la pérdida de diferenciación, que le confiere “ventajas” a las células cancerosas; por ejemplo, permite a la célula mantener un estado de proliferación activo, ayuda a evadir la senescencia celular y puede conferir ventajas en el proceso de metástasis.
- 12) Reprogramación epigenética, el microambiente tumoral aberrante puede generar cambios en el epigenoma que favorezcan el crecimiento clonal de las células cancerosas.
- 13) Microbiomas polimórficos, ahora se sabe que la relación que existe entre la microbiota y nuestro organismo puede tener consecuencias en el estado de salud-enfermedad, tal es el caso del cáncer de colon en el que se sospecha que el microbioma puede participar en el desarrollo y patogénesis de dicha enfermedad.

Adicionalmente se han caracterizado diversos ambientes tumorales en los que se han localizado bacterias en el interior, y finalmente.

- 14) Senescencia celular, esta característica se ha visto como una protección contra la formación de células cancerosas; sin embargo, bajo ciertas circunstancias las células senescentes pueden estimular el desarrollo y progresión del cáncer (Hanahan, 2022).

Estas características en el desarrollo y el mantenimiento del cáncer se pueden observar de manera general en los múltiples tipos de cáncer.

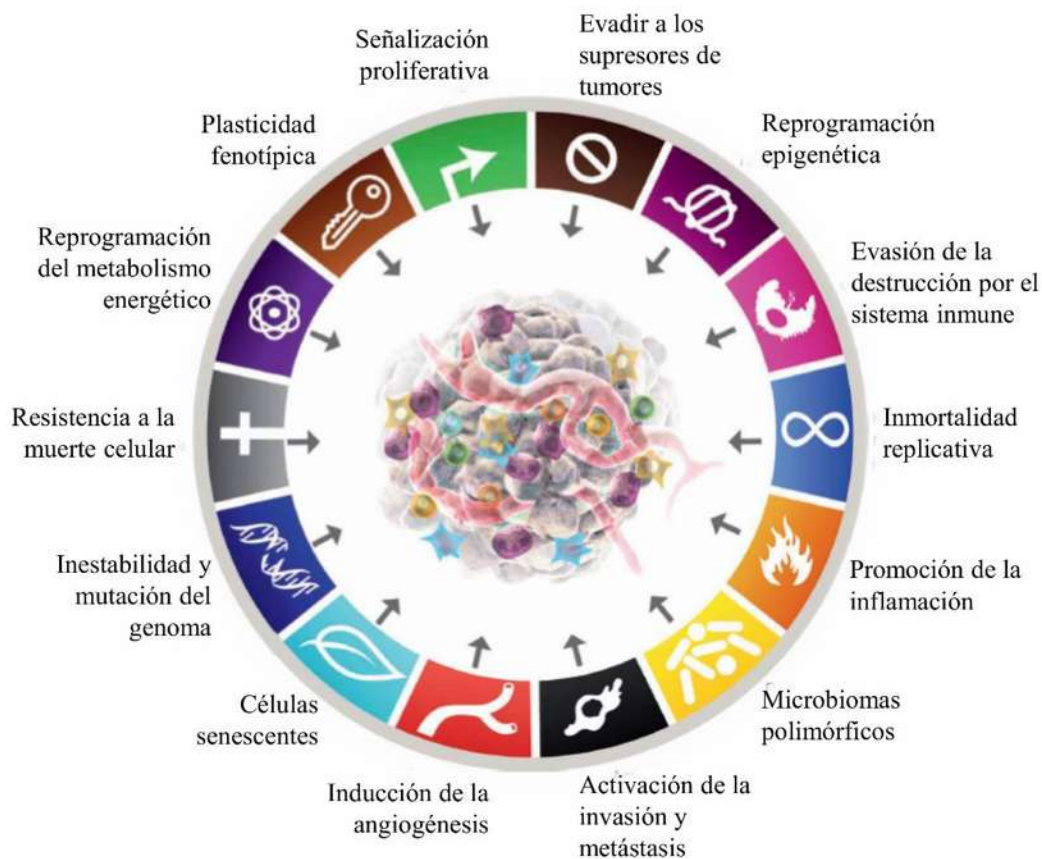


Figura 1. Características distintivas del cáncer. La ilustración recopila las características que reúnen todas las células de los diversos tipos de cáncer, para su desarrollo y mantenimiento. Adaptado de Hanahan, 2022.

Existen diversas formas de clasificar el cáncer, entre ellas la OMS los clasifica a través de sus características citológicas, morfológicas y estructurales; además, se asigna un grado de acuerdo al nivel de diferenciación celular. Por otra parte, también pueden clasificarse de acuerdo a su estadio, esto indica el grado de diseminación en el organismo (clasificación TNM, Tumor Node Metastasis). La forma más clásica de catalogar a los cánceres es a través del tejido u órgano del cual proceden; por ejemplo, 1) carcinomas, si su origen es de células epiteliales de órganos internos, de la piel, tracto gastrointestinal u otros sitios anatómicos, 2) sarcomas, si provienen de tejido adiposo, hueso, músculo o vasos sanguíneos. Todos los mencionados anteriormente están clasificados además como cánceres sólidos que se distinguen de los cánceres hematológicos, que son aquellos cuyo origen está en las células sanguíneas (Carbone, 2020).

1.1.1. Cáncer hematológico

El cáncer hematológico abarca los linfomas, las leucemias y el mieloma de acuerdo con el tipo de células que se ven afectadas por dicha enfermedad, estos pueden incidir en ganglios linfáticos, células sanguíneas o células plasmáticas de médula ósea, respectivamente. En América Latina, estas enfermedades representan el 7% de todos los cánceres, y para la población mayor a los 20 años de edad el 9.8% de todas las muertes por cáncer (Doubova *et al.*, 2020). En cuanto a la población infantil, la Sociedad Americana del Cáncer reportó para el periodo del 2018-2020 que la leucemia y el linfoma se encontraban entre los tres principales tipos de cáncer.

1.1.1.1. Leucemia

1.1.1.1.1 Definición y epidemiología

El término leucemia proviene de los vocablos griegos “leukos” y “heima”, que describe un exceso de leucocitos en el cuerpo (Olsen, 2016), y se define como una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético, caracterizada por la proliferación no regulada de células progenitoras hematopoyéticas (McKenzie *et al.*, 2000).

La IARC reportó (2018) que la leucemia fue el decimoquinto cáncer más comúnmente diagnosticado a nivel mundial. Esta enfermedad se presenta de manera más frecuente en hombres que en mujeres. En cuanto a la distribución por edad, la leucemia crónica es unimodal, con tasas de incidencia que aumentan con la edad. Mientras que la leucemia aguda (mieloide y linfóide) inciden más en la población infantil. Además, de acuerdo con este reporte, el número total de casos de leucemia a nivel mundial reportados entre el 2005 y 2015 ha incrementado un 26% (Baeker *et al.*, 2020).

Informes de esta misma agencia, en la base de datos del GLOBOCAN, indican que en México la incidencia de leucemia se encuentra entre los 10 principales tipos de cáncer que afectan a la población. En cuanto a la mortalidad, la leucemia se encuentra en el tercer lugar de muertes por cáncer, lo que representa un 8% de la población con cáncer. Además, a nivel Latinoamérica y el Caribe, la leucemia sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer para la población infantil, esto representa un desafío importante para la salud pública. Las mejoras en la supervivencia se ven obstaculizadas por factores como el diagnóstico tardío de la enfermedad, el abandono del tratamiento, así como la falta de recursos económicos y el acceso a la atención médica (Torres-Roman *et al.*, 2020).

1.1.1.1.2. Clasificación y diagnóstico

Las leucemias han sido clasificadas ampliamente a través de diversas características de la enfermedad, inicialmente en la década de 1930 se clasificaron según el tipo de célula producida anormalmente como leucemias mieloides, si la célula progenitora de la que deriva es de tipo mielocítico, o leucemias linfoides, si el origen de la célula progenitora de la que se deriva es de tipo linfocítico. Además, en función del estadio de maduración celular se pueden clasificar como agudas y crónicas. Las leucemias agudas se caracterizan por un “cese madurativo” con acumulación de precursores hematopoyéticos inmaduros en la médula ósea, si la enfermedad no es tratada, esta acumulación conduce rápidamente a un fallo medular e infiltración orgánica por acumulación. Por su parte, en la leucemia crónica se produce una acumulación en médula ósea de células diferenciadas o parcialmente diferenciadas de forma más lenta, estas células pueden ser diferenciadas o parcialmente diferenciadas con una

proliferación aumentada y un exceso de supervivencia, y al conservar su capacidad de diferenciación son menos invasivas (Baeker Bispo *et al.*, 2020).

Por otra parte, en el año de 1976, un grupo de hematólogos propuso un sistema de clasificación para las leucemias linfoides (Fig. 2) y mieloides (Fig. 3) agudas, denominado clasificación FAB (Franco Americano Británica). Este sistema se basa en la morfología celular, indicando el estadio de maduración o el tipo celular, para ello se utiliza una tinción rutinaria y su posterior análisis al microscopio óptico (Bennett *et al.*, 1976; Ladines-Castro *et al.*, 2016). Esta clasificación aún ayuda con la identificación de las leucemias agudas, aunque no se usa como un parámetro exclusivo para el diagnóstico de la enfermedad.

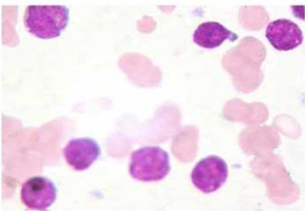
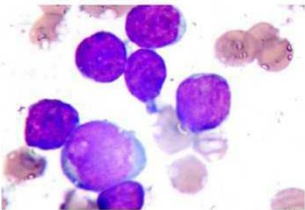
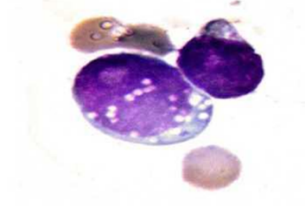
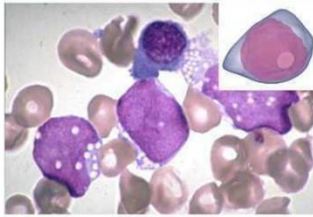
Clasificación FAB de la leucemia linfoblástica													
	<p>L1 Leucemia linfoblástica con homología de estructura (típica infantil)</p> <p>Frecuencia: En adultos entre un 25 a 30% de los casos y en niños 85% de los casos.</p> <p>Morfología: Los blastos son homogéneos, tienen un núcleo regular, cromatina homogénea, citoplasma pequeño y de leve a moderada basofilia.</p> <p>Inmunofenotipo:</p> <table border="0"> <tr> <td>B:</td> <td>T:</td> </tr> <tr> <td>* CD19</td> <td>* CD3</td> </tr> <tr> <td>* CD22</td> <td>* CD7</td> </tr> <tr> <td>* CD79a</td> <td>* CD5</td> </tr> <tr> <td>* CD10</td> <td>* CD2</td> </tr> <tr> <td>* CD20</td> <td>* CD4</td> </tr> </table>	B:	T:	* CD19	* CD3	* CD22	* CD7	* CD79a	* CD5	* CD10	* CD2	* CD20	* CD4
B:	T:												
* CD19	* CD3												
* CD22	* CD7												
* CD79a	* CD5												
* CD10	* CD2												
* CD20	* CD4												
	<p>L2 Leucemia Linfoblástica con variedad de estructura (atípica adulto)</p> <p>Frecuencia: En adultos aproximadamente un 70% de los casos y en niños 14%.</p> <p>Morfología: Núcleos irregulares, cromatina heterogénea y nucléolo largo.</p> <p>Inmunofenotipo:</p> <table border="0"> <tr> <td>B:</td> <td>T:</td> </tr> <tr> <td>* CD19</td> <td>* CD3</td> </tr> <tr> <td>* CD22</td> <td>* CD7</td> </tr> <tr> <td>* CD79a</td> <td>* CD5</td> </tr> <tr> <td>* CD10</td> <td>* CD2</td> </tr> <tr> <td>* CD20</td> <td>* CD4</td> </tr> </table>	B:	T:	* CD19	* CD3	* CD22	* CD7	* CD79a	* CD5	* CD10	* CD2	* CD20	* CD4
B:	T:												
* CD19	* CD3												
* CD22	* CD7												
* CD79a	* CD5												
* CD10	* CD2												
* CD20	* CD4												
	<p>L3 Leucemia de Burkitt</p> <p>Frecuencia: Subtipo raro, se cuentan aproximadamente el 1 o 2% de todos los casos.</p> <p>Morfología: Blastos largos, núcleo prominente, cromatina homogénea punteada, citoplasma abundante, vacuolas.</p> <p>Inmunofenotipo:</p> <table border="0"> <tr> <td>B:</td> <td>T:</td> </tr> <tr> <td>* CD19</td> <td>* CD3</td> </tr> <tr> <td>* CD22</td> <td>* CD7</td> </tr> <tr> <td>* CD79a</td> <td>* CD5</td> </tr> <tr> <td>* CD10</td> <td>* CD2</td> </tr> <tr> <td>* CD20</td> <td>* CD4</td> </tr> </table>	B:	T:	* CD19	* CD3	* CD22	* CD7	* CD79a	* CD5	* CD10	* CD2	* CD20	* CD4
B:	T:												
* CD19	* CD3												
* CD22	* CD7												
* CD79a	* CD5												
* CD10	* CD2												
* CD20	* CD4												

Figura 2. Clasificación FAB para la leucemia linfoblástica aguda. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) categorizada por su morfología, se muestra la frecuencia de aparición en la población y el inmunofenotipo característico de cada leucemia (Bennett *et al.*, 1976; Ladines-Castro *et al.*, 2016).

Clasificación FAB de la leucemia mieloide aguda



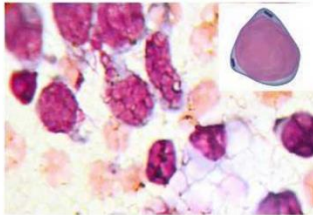
M0 Leucemia mieloblástica aguda con mínima diferenciación

Morfología:

Los blastos pueden parecerse a la LLA-L2. Los blastos son de tamaño mediano, núcleo redondeado, cromatina fina, citoplasma basofílico no granula, nucléolo prominente.

Inmunofenotipo:

- CD13 +
- CD33 +
- CD11b +
- CD11c +
- CD14 +
- CD15 +



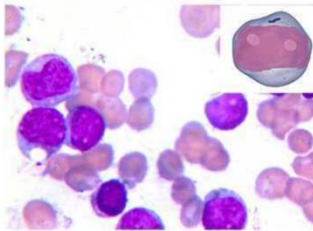
M1 Leucemia mieloblástica aguda sin maduración

Morfología:

Blastos de tamaño mediano con un alto radio de núcleo, núcleo redondeado inmaduro, cromatina dispersa con uno o más nucléolos. Los blastos muestran una fina granulación azurofílica, bastones de Auer aislados en el citoplasma en el 5-10% de los casos.

Inmunofenotipo:

- MPO +
- CD13 +
- CD33 +
- CD117 +
- CD 34 +/-



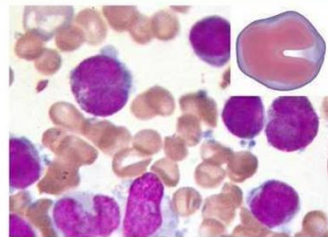
M2 Leucemia mieloblástica aguda con maduración

Morfología:

Blastos de medianos a pequeños con un núcleo grande, nucléolos a veces colocados en las orillas del núcleo. Cromatina inmadura con uno o más nucléolos. Citoplasma basofílico y pueden contener granulación azurofílica o bastones de Auer.

Inmunofenotipo:

- MPO +
- CD13 +
- CD15 +
- CD 34 +/-
- HLA-DR +/-
- Sudan Black +
- CD 117 +/-



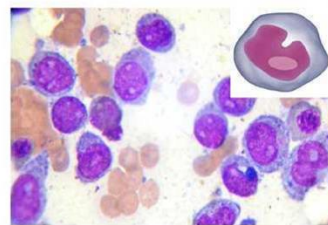
M3 Leucemia promielocítica

Morfología:

Granulación azurofílica intensa y abundante. Núcleo con forma usualmente monocítica (reniforme) y es irregular o bilobulado con una hendidura profunda. Citoplasma apenas basofílico con granulación azurofílica. Algunos tienen inclusiones citoplasmáticas cristalinas alargadas o en forma de astilla que forman grupos.

Inmunofenotipo:

- CD13 +
- CD33 +
- HLA-DR +
- CD34 +



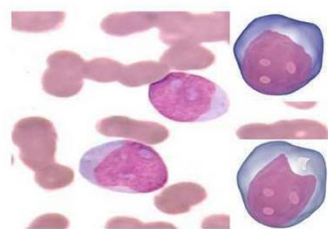
M4 Leucemia mielomonocítica aguda

Morfología:

Blastos largos, radio núcleo:citoplasma moderado y basofilia variable. El núcleo puede ser redondeado, en forma de riñón o irregular. Nucléolo es usualmente prominente.

Inmunofenotipo:

- CD13 +
- CD15 +
- CD33 +
- CD11b +
- CD11c +
- CD14 +
- CD4
- CD6



M5 Leucemia monocítica aguda

Morfología:

5a: Blastos largos rodeado de núcleos y cromatina inmadura (1-3 nucléolos), citoplasma basofílico y puede mostrar bastones de Auer y/o prolongaciones y granulación.
5b: promonocitos con núcleo redondeado o con forma de riñón con menos citoplasma basofílico, es más granulado y contiene vacuolas. Hallazgo de eritrofagocitosis con blastos monocíticos sugiere una translocación t(8;16).

Inmunofenotipo:

- CD14 +
- CD68 +
- CD4 +
- CD11c +
- CD64 +
- HLA-DR +

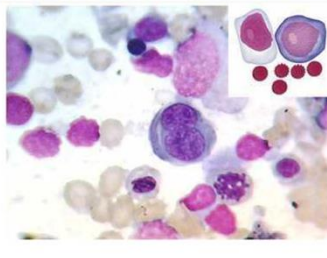
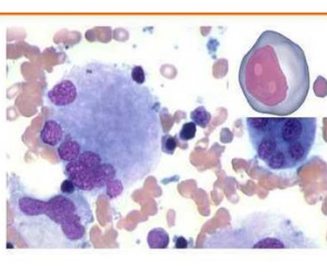
	<p>M6 Leucemia eritroide aguda</p> <p>Morfología: 6a (blastos de proliferación mixta): 50% de precursores eritroies y 30% de mieloblastos. Eritrocitos en sangre periférica con esquistocitos, células en pinza o en forma de champiñón, y equinocitos y acantocitos espiculados. 6b (pura): Los eritroides constituyen el 80% de las células de la médula ósea, con menos del 3% de células mieloides. En sangre periférica los eritrocitos consisten en macrocitos, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly o anillos de Cabot.</p>	<p>Inmunofenotipo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • CD13 + • CD33 + • CD15 + • Glicoforina A + • Glicoforina C +
	<p>M7 Leucemia megacariocítica aguda</p> <p>Morfología: Blastos polimórficos e inmaduros. El núcleo céntrico con cromatina dispersada, reticulada y de 1 a 3 nucléolos prominentes. El citoplasma es basofílico no granular, con pseudopodos o granulación. Micromegacariocitos y fragmentos de megacarioblastos son vistos en sangre periférica (gigantes plaquetas, algunas degradadas).</p>	<p>Inmunofenotipo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • CD41 + • CD61 + • CD42 + • CD13 + • CD33 + • CD34+

Figura 3. Clasificación FAB para la leucemia mieloblástica aguda. La leucemia mieloblástica aguda (LMA) categorizada por su morfología y el inmunofenotipo característico de cada leucemia (Bennett *et al.*, 1976; Ladines-Castro *et al.*, 2016).

Posteriormente comenzó a incorporarse a la clasificación datos inmunofenotípicos (Fig. 2 y 3), citogenéticos y moleculares para definir categorías diagnósticas de la enfermedad. El inmunofenotipo permite identificar con precisión el estadio de diferenciación celular, basado en los marcadores de superficie que exhiben las células en los distintos estadios de maduración, esto sirve como una herramienta de clasificación y diagnóstico para las leucemias. Por otra parte, la citogenética permite determinar las mutaciones cromosómicas presentes en las leucemias y funcionan como un indicador diagnóstico, valor pronóstico y predictivo para las leucemias (Cernan *et al.*, 2017; DiGiuseppe & Wood, 2019; Peters & Ansari, 2011).

La OMS clasificó a las leucemias, linfomas y sarcomas reuniendo características morfológicas, citogenéticas y moleculares. Para propósitos de este trabajo, únicamente se muestra la clasificación de las leucemias (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la OMS para las neoplasias hematopoyéticas*. Los nombres en mayúscula con cursiva indican los genes mutados. Las mutaciones cromosómicas están indicadas como inv (inversión) y t (translocación), en cuanto a su posición en el cromosoma los brazos se nombrarán por p (brazo corto) y por q (brazo largo) y los números indican la sección el brazo donde se localiza.

Neoplasias de precursores linfoides

- Leucemia linfoblástica B (LLB)
- Leucemia linfoblástica B, sin especificación
- Leucemia linfoblástica B, con anomalías genéticas o citogenéticas recurrentes
 - LLB con t(9;22)(q34;q11,2), *BCR-ABL1*
 - LLB con t(11q23), *MLL* reorganizada
 - LLB con t(12;21)(p13;q22), *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*
 - LLB con hiperdiploidia
 - LLB con hipodiploidia (LLA hipodiploide)
 - LLB con t(5;14)(q31;q32), *IL3-IGH*
 - LLB con t(1;19)(q23;p13.3), *E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)*
- Leucemia linfoblástica T (LLT)

Neoplasias de células B maduras

- Leucemia linfocítica crónica
- Leucemia prolinfocítica de células B
- Leucemia de células pilosas
- Leucemia esplénica inclasificable (variante de leucemia de células pilosas)

Neoplasias de células T y natural killer

- Leucemia prolinfocítica de células T
- Leucemia linfocítica granular de células T largas
- Leucemia de células T del adulto

Neoplasias mieloproliferativas

- Leucemia mielóide crónica, *BCR-ABL1* positiva
- Leucemia neutrofílica crónica
- Leucemia eosinofílica crónica, sin otras especificaciones
- Neoplasia mieloproliferativa, inclasificable
- Neoplasias mieloides y linfoides asociadas con eosinofilia y anomalías de *PDGFRA*, *PDGFRB* o *PFFR1*

Mielodisplasas/neoplasias mieloproliferativas

- Leucemia mielomonocítica crónica
- Leucemia mielóide crónica atípica, *BCR-ABL1* negativa
- Leucemia mielomonocítica juvenil
- Mielodisplasia/neoplasia mieloproliferativa, no clasificable

Leucemia mieloide aguda

- Leucemia mielode agua (LMA) con anomalías recurrentes
 - LMA con t(8;21)(q22;q22), *RUNX1-RUNX1T1*
 - LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22), *CBFB-MYH11*
 - Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q11-12), *PML-RARA*
 - LMA con t(9;11)(p22;q23), *MLLT3-MLL*
 - LMA con t(6;9)(P23;Q34), *DEK-NUP214*
 - LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2), *RPN1-EVII*
 - LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13), *RBM15-MKL1*
 - LMA con mutación *NPM1*
 - LMA con mutación *CEBPA*
- Leucemia mieloide aguda con cambios relacionados con mielodisplasia
- Neoplasia mieloide relacionada a terapias
- Leucemia mieloide aguda, no categorizada
 - LMA con diferenciación mínima
 - LMA sin maduración
 - LMA sin maduración
- Leucemia mielomonocítica aguda
- Leucemia monoblástica y monocítica aguda
- Leucemia eritroide aguda
 - Leucemia eritroide aguda, eritroide/mieloide
 - Leucemia eritroide pura aguda
- Leucemia megacarioblástica aguda
- Leucemia basofílica aguda
- Leucemias agudas con ambigüedad de linaje
 - Leucemia aguda indiferenciada
 - Leucemia aguda bifenotípica

*Modificado de (Hoffbrand *et al.*, 2016).

1.1.1.1.3. Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo a los que se les ha atribuido la enfermedad se encuentran: antecedentes familiares como mutaciones en la línea germinal, es decir, mutaciones que pasan de padres a hijos, la radiación, quimioterapia, exposición a químicos, síndromes y anomalías genéticas y factores del estilo de vida como fumar. Además, existen hipótesis que respaldan la teoría de que la leucemogénesis puede ser provocada por la falta de una estimulación inmunitaria temprana, es decir, la exposición a infecciones comunes en la infancia, aunque cabe señalar que estas teorías no están respaldadas por todos los estudios (Tabla 2) (Baeker Bispo *et al.*, 2020; Klco & Mullighan, 2021).

Tabla 2. Factores de riesgo asociados al desarrollo de leucemias. (Baeker Bispo *et al.*, 2020; Klco & Mullighan, 2021)

Factor de Riesgo	Ejemplos
Antecedentes familiares	Mutaciones de la línea germinal en la LMA: <ul style="list-style-type: none"> ▪ RUNX1 ▪ GATA2 ▪ ETV6 ▪ CEPBA Mutaciones en la línea germinal en la LLA: <ul style="list-style-type: none"> ▪ PAX5 ▪ IKZF1 ▪ ETV6
Síndromes y anomalías genéticas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Síndrome de Down ▪ Síndrome de Li-Fraumeni ▪ Neurofibromatosis ▪ Anemia de Fanconi ▪ Síndrome de Bloom ▪ Síndrome de Kostmann, ▪ Anemia de Diamond-Blackfan ▪ Disqueratosis congénita ▪ Síndrome de Schwachman-Diamond
Radiación	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Radiación ionizante de las tomografías computarizadas ▪ Radiación ionizante para tratar un cáncer primario
Exposición a químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Quimioterapia con agentes alquilantes para cáncer primario • Inhibidores de la topoisomerasa II para cáncer primario • Benceno por proximidad al tráfico de automóviles y las fábricas
Estilo de vida	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tabaquismo

1.1.1.1.4. Etiología

La enfermedad se desarrolla en un proceso de varias etapas que comienza con la transformación (mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas) de las células madre hematopoyéticas (CMH), cuyas alteraciones mejoran la capacidad de autorrenovación celular mientras mantienen un estado indiferenciado o parcialmente diferenciado (Greim *et al.*, 2014; Whitehead *et al.*, 2016).

Las CMH localizadas en el nicho de la médula ósea son responsables de la formación de las células sanguíneas e inmunitarias (Fig. 4). Se autorrenuevan, sostienen y regeneran todo el

sistema hematopoyético, primero generando progenitores multipotentes y luego progenitores más diferenciados y comprometidos de linaje, que gradualmente dan origen a cada uno de los tipos de células sanguíneas maduras (Yamashita *et al.*, 2020).

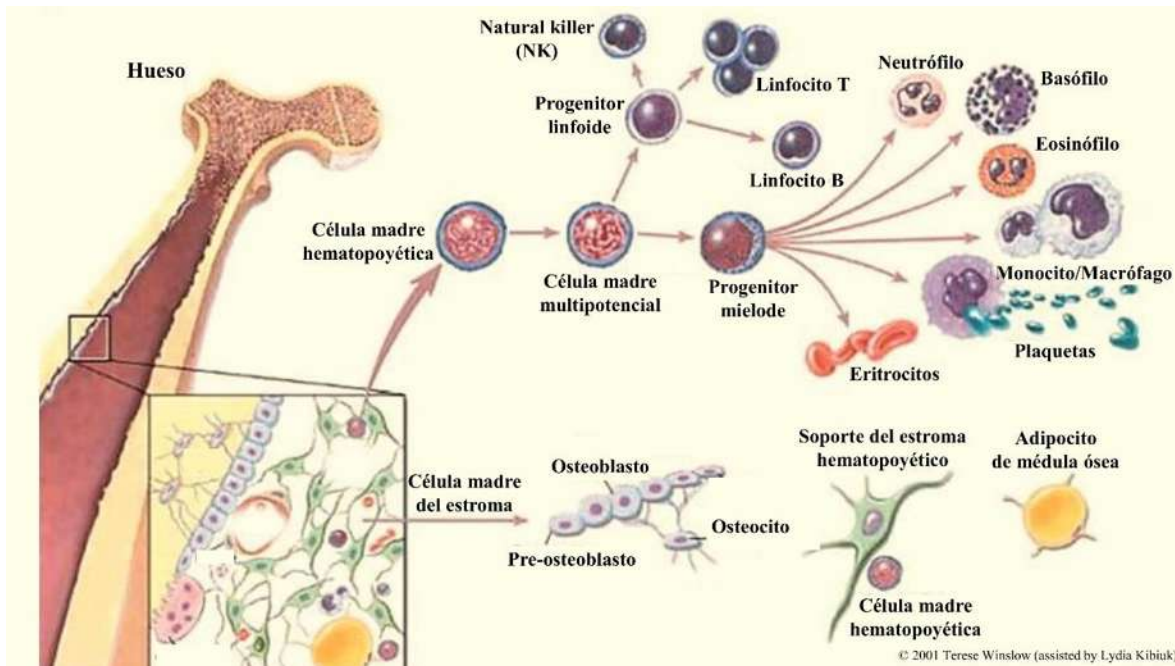


Figura 4. Nicho de la médula ósea. En esta imagen se muestra la diferenciación de las células hematopoyéticas dentro del nicho de la médula ósea. Adaptado de (Greim *et al.*, 2014).

Las alteraciones a las que se enfrentan las CMH pueden ser: mutaciones cromosómicas, mutaciones genéticas (puntuales) y alteraciones epigenéticas. En muchas ocasiones ocurre la combinación de todas ellas.

1.1.1.1.4.1. Mutaciones cromosómicas

Las mutaciones cromosómicas suelen presentarse en más del 50% de los pacientes con neoplasias hematológicas. Las células humanas normales constan de 46 cromosomas totales, en las células leucémicas se han observado anomalías tales como una pérdida (monosomía, pérdida de un cromosoma) o ganancia de uno o más cromosomas (trisomía, por ganancia de un cromosoma o hiperdiploidía por ganancia de múltiples cromosomas). Por otra parte, también se han observado mutaciones a nivel de estructura de los cromosomas, principalmente deleciones, que implican la pérdida de segmentos de un cromosoma;

inversiones, que implica un cambio en el sentido de un segmento cromosómico; duplicación, en la que se repite un segmento del cromosoma; inversión, en la que cambia el sentido de un segmento cromosómico; translocaciones, que implica el desplazamiento de un segmento cromosómico a un nuevo lugar en el genoma; e inserción, en la que un segmento de un cromosoma se agrega a otro cromosoma (Fig. 5) (Arana *et al.*, 2017). Estas alteraciones en los cromosomas alteran la secuencia de genes que participan en funciones importantes como la apoptosis, control de ciclo celular, regulación de proliferación y diferenciación celular, por lo que estas mutaciones son clave para el desarrollo de la enfermedad (Lavaut, 2020).

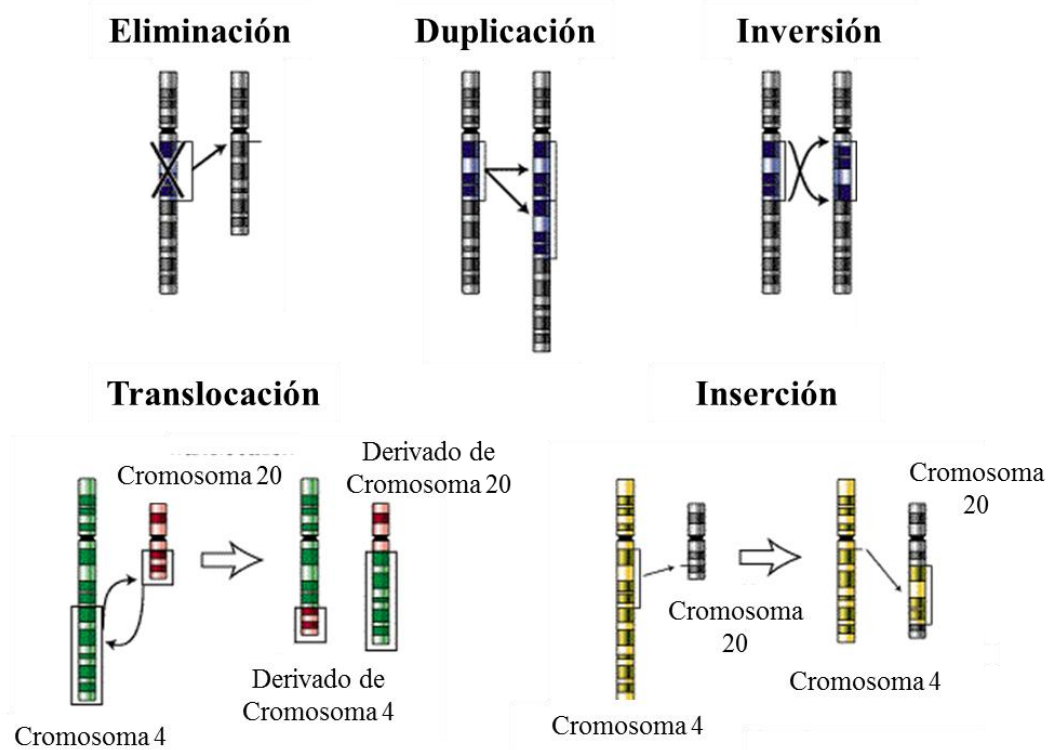


Figura 5. Representación de las mutaciones cromosómicas. En la imagen se muestran las diferentes mutaciones que puede sufrir un cromosoma. Obtenido de: NHGRI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/mutation_chromosome.html).

1.1.1.1.4.2. Mutaciones genéticas (puntuales)

Como se mencionó anteriormente, en las leucemias las alteraciones clave en el desarrollo de la enfermedad comprenden la capacidad aumentada de proliferar y la pérdida de diferenciación en el linaje celular. Estos cambios requieren de la acumulación de mutaciones

puntuales, mutaciones cromosómicas, así como de alteraciones genéticas en un solo linaje de células a través del tiempo. Aquellas células que acumulan algunas, pero no todas las mutaciones responsables de la enfermedad, se denominan CMH preleucémicas. Se ha propuesto un modelo sobre la evolución de las células preleucémicas hasta convertirse en células leucémicas (Fig. 6). Las células preleucémicas adquieren algunas de las mutaciones necesarias para el desarrollo de la leucemia, y su capacidad de proliferación ilimitada permitirá que las mutaciones se mantengan a través del tiempo, las mutaciones se van acumulando conforme los linajes se autorrenuevan, y eventualmente, una de las CMH preleucémica o alguna progenie de ella, adquiere una mutación adicional que la lleva a la pérdida de la función normal y al desarrollo de la leucemia (Corces-Zimmerman & Ravindra, 2014).

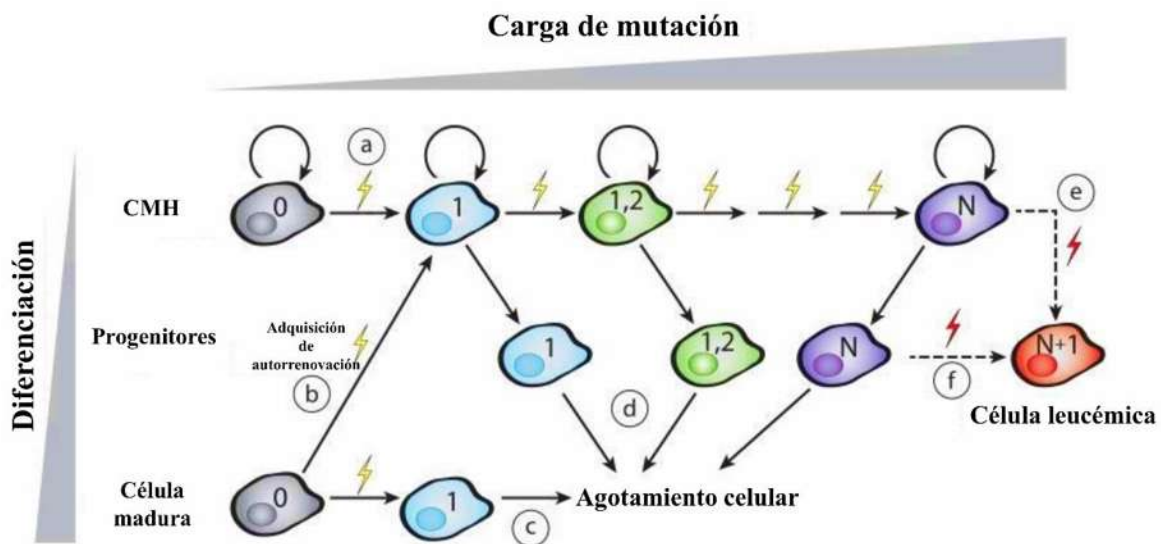


Figura 6. Modelo de la evolución preleucémica a leucemia. La adquisición secuencial de mutaciones se ilustra mediante los cambios de color. (a) Se muestra la primera mutación que ocurriría en una CMH que se autorrenueva. Además, la primera mutación también puede ocurrir en una célula más diferenciada, esta mutación podría conferirle la capacidad de autorrenovación (b) o se perdería la mutación con el agotamiento de linaje (c). Las mutaciones subsiguientes se acumulan y se conserva la capacidad de autorrenovación y diferenciación (d). Posteriormente una de las mutaciones conduce a la generación de una célula leucémica con pérdida de la función. Esto se puede producir en una CMH (e) o en una célula progenitora (f). Tomado de Corces-Zimmerman & Ravindra (2014).

El desarrollo de la enfermedad no está limitado a las mutaciones en las CMH, los cambios en el microambiente del nicho de la médula ósea contribuyen al proceso de leucemogénesis, por ejemplo, un ambiente de tipo inflamatorio (incremento de citocinas) o un aumento en la biodisponibilidad de factores de crecimiento, puede impulsar la evolución clonal de las CMH preleucémicas para volverse leucémicas. Además, se sabe que las CMH están sujetas a adquirir mutaciones espontáneas relacionadas con la edad (Yamashita *et al.*, 2020).

1.1.1.1.4.3. Alteraciones epigenéticas

El proceso de leucemogénesis también está relacionado con alteraciones epigenéticas. La epigenética estudia los cambios en la expresión de genes que no implican una modificación en la secuencia de DNA, estos incluyen la metilación directa sobre el DNA, modificaciones químicas en las colas de las histonas, los microRNAs (miRNA), complejos remodeladores de cromatina y en general la dinámica nuclear que responde a la organización de la cromatina (Dupont *et al.*, 2009). Las alteraciones en estas marcas epigenéticas juegan un rol importante en el desarrollo y la progresión del cáncer, éstas pueden interferir en procesos fundamentales como la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, inhibición de genes supresores de tumores, aumentado la expresión de oncogenes e impidiendo la diferenciación celular.

En el caso particular de las leucemias, las alteraciones epigenéticas pueden aparecer en la etapa preleucémica y éstas ocurren directamente en los genes encargados de la producción de modificadores epigenéticos. Las mutaciones subyacentes a la etapa preleucémica pertenecen a dos categorías; cambios en el estado de metilación del DNA o las alteraciones químicas en las histonas (Chen *et al.*, 2010; Corces *et al.*, 2017).

La metilación del DNA implica la adición de un grupo metilo al carbono 5' de las citosinas del DNA en regiones conocidas como islas CpG, esta función es llevada a cabo a través de una enzima denominada DNA metiltransferasa (DNMT). Aproximadamente el 40% de las metilaciones en el DNA ocurren en las regiones promotoras de los genes, por lo que como consecuencia esta modificación implica la represión génica o compactación de la cromatina (Allis *et al.*, 2007). Las células leucémicas exhiben una hipometilación global; sin embargo,

también se puede presentar una metilación aberrante en las islas CpG dentro de los promotores de los genes o regiones codificantes (Chen *et al.*, 2010). Algunos de los genes que se han encontrado metilados son genes supresores de tumores (ej. p53, DAPK1), genes de regulación de ciclo celular (ej. CDKN2B o p15, CDKN2A o p16), apoptosis (ej. CDKN1A o p21, DAPK1), entre otros (Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017).

En cuanto a las modificaciones químicas en las histonas, éstas se llevan a cabo principalmente en los aminoácidos lisina, serina y treonina de la parte amino terminal de las histonas. Las principales modificaciones son: metilación, fosforilación y acetilación, aunque existen mucha más. El cambio en las marcas de las histonas tiene como consecuencia la activación o represión génica, es decir, de apertura o compactación de la cromatina. Las marcas de metilación pueden tener efecto de represión o activación génica, mientras que las marcas de acetilación y fosforilación son principalmente de activación. Dichas modificaciones son llevadas a cabo por enzimas a las que se les denominan: 1) escritores, enzimas que colocan las marcas en las histonas, 2) borradores, enzimas que eliminan marcas epigenéticas en las histonas, y 3) lectores, enzimas encargadas del reconocimiento de las marcas epigenéticas a través de dominios específicos, este reconocimiento permite un cambio en la expresión de genes atrayendo a escritores o borradores al lugar donde son requeridos. En la fig. 7 se muestran algunos ejemplos de estas enzimas epigenéticas. Por otra parte, los complejos remodeladores de cromatina remueven partes (dímeros) o los octámeros completos de las histonas para liberar la secuencia de DNA la cual estaban unidos y son intercambiados por otras histonas para cambiar la expresión génica. Estos cambios ocurren en procesos como reparación de DNA, activación o represión transcripcional, desarrollo y replicación (Allis *et al.*, 2007; Biswas & Rao, 2018; Clapier *et al.*, 2017).

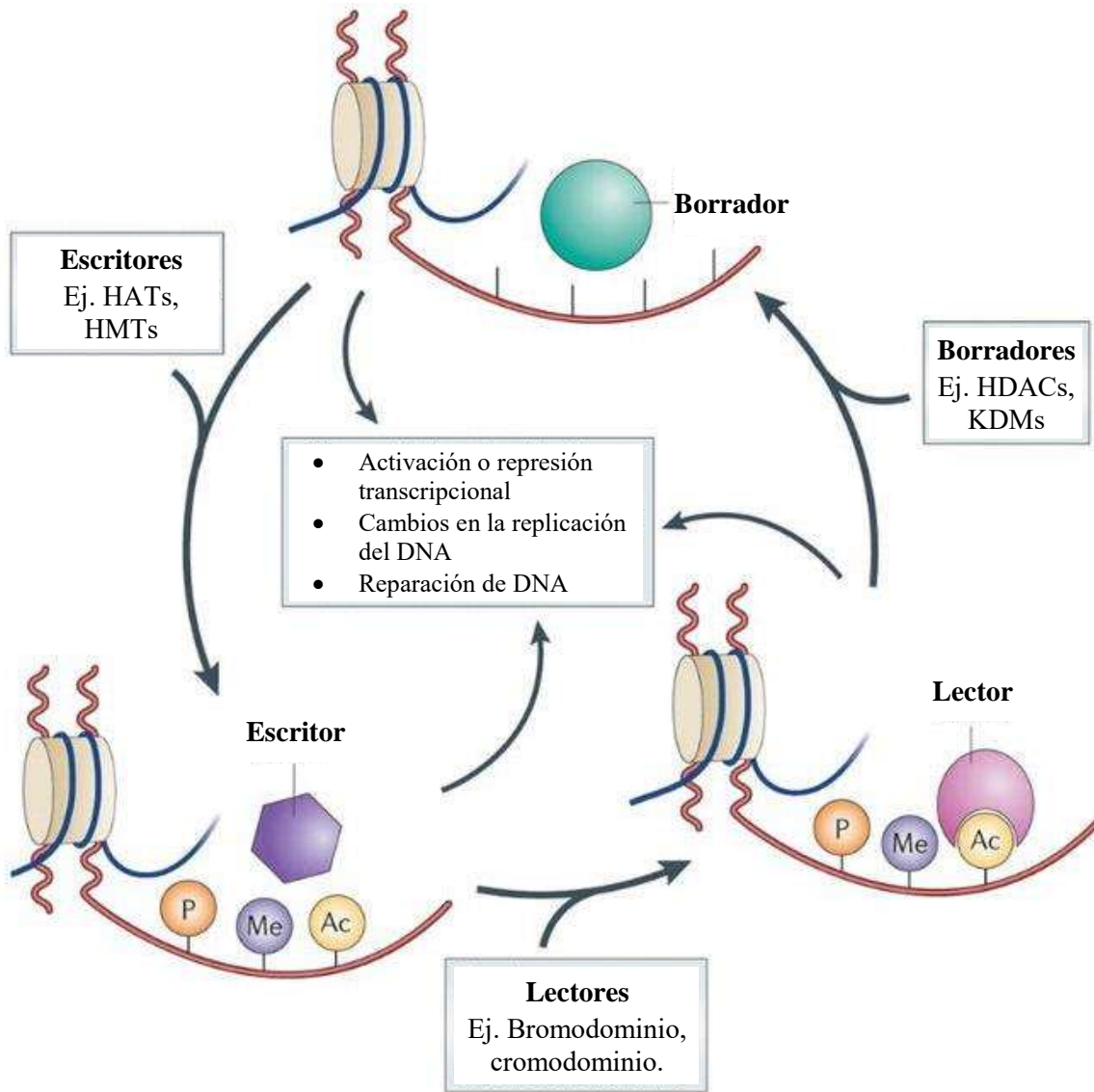


Figura 7. Enzimas epigenéticas responsables de las modificaciones de histonas. La imagen muestra ejemplos de algunas enzimas epigenéticas. Los escritores, HAT (histona acetiltransferasa) que colocan marcas de acetilación, HMT (histona metiltransferasa) encargada de colocar las marcas de metilación en las histonas. Los borradores, HDAC (histona desacetilasa) enzima encargada de eliminar las marcas de acetilación y la KDM (lisina desmetilasa) encargada de quitar marcas de metilación. En cuanto a los lectores se muestran algunos dominios de reconocimiento en las histonas para la modificación en la expresión de genes. P: fosforilación, Me: metilación, Ac: acetilación. Adaptada de Falkenberg & Johnstone (2014).

En las leucemias las marcas químicas de las histonas pueden alterarse a través de tres mecanismos: 1) Mediante alteraciones directas en los genes encargados de la producción de las enzimas epigenéticas, 2) alteraciones genéticas que conducen al reclutamiento anormal

de modificadores epigenéticos, y 3) por el reclutamiento de modificadores epigenéticos a través de las marcas de metilación aberrante en el DNA (Liu *et al.*, 2020).

Las alteraciones directas sobre las enzimas epigenéticas se producen generalmente de las mutaciones cromosómicas y sus productos de fusión, por ejemplo en la LMA la acetiltransferasa, p300, fusionada con el gen MLL por una translocación t(11;22), genera un producto de fusión que impide la regulación de ciclo celular y la diferenciación celular lo que contribuye a la leucemogénesis (Ohnishi *et al.* 2008).

Respecto al reclutamiento de modificadores epigenéticos provocado por una alteración genética, un ejemplo es la translocación t(8;21) cuya proteína de fusión AML1/ETO, presente en la LMA, que atrae un complejo represor que contiene H-CoR/Sin3/HDAC, resultando en una represión transcripcional y un bloqueo de la diferenciación mieloide (Liu *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha reportado que el gen de fusión ETV6-RUNX1 recluta HDACs en la LLA-B, bloqueando la transcripción de genes activados normalmente por RUNX1 (Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017).

Sobre las modificaciones de histonas por metilación del DNA, los sitios CpG metilados desencadenan la unión de proteínas que atraen a HDACs o HMTs, esto da como resultado la desacetilación y metilación de marcas epigenéticas en las histonas, por ejemplo, desacetilación en la lisina (K) 9 de la histona 3 (H3) (H3K9) o en marcas de desmetilación en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4) (Liu *et al.*, 2020).

Otros reportes de alteraciones epigenéticas indican que las enzimas epigenéticas por si mismas también pueden estar sobreexpresadas en las leucemias, este es el caso de enzimas como las desacetilasas de histonas HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC7 y HDAC8, estas enzimas pueden involucrarse en procesos de transcripción (HDAC1, 3, 4, 6, 7 8 y 9), regulación de ciclo celular (HDAC1, 2, 3, 4 6, y 7), apoptosis (HDAC1, 2, 3, 6 y 7) y vías de señalización como p53 (HDAC2) y Notch (HDAC1, 3 y 7). Otros reportes de enzimas epigenéticas sobreexpresada en LLA son las HATs GNAT, MYST, CBP/p300, algunas de ellas como parte de los rearrreglos cromosómicos antes mencionados. En cuanto a las HMT,

la más estudiada en la LLA es la MLL, que metila un residuo de lisina (K) 4 en la histona 3 (H3K4), que genera apertura de la cromatina y por tanto favorece la transcripción (Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017).

Finalmente los miRNA, son RNAs cortos (18-25 nucleótidos) no codificantes que regulan la expresión génica a través de la interacción con el mRNA, hasta el 60% de los mRNAs es regulado a través de miRNAs. Esta regulación está involucrada en procesos de diferenciación, proliferación, metabolismo y apoptosis. En el cáncer, los miRNAs participan como oncogenes, supresores de tumores o supresores o activadores de metástasis (Allis *et al.*, 2007; Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017).

1.1.1.1.5. Tratamiento

Los diversos tipos de leucemia son tratadas de acuerdo a su clasificación, pronóstico, fase de la enfermedad (aguda, crónica, crisis blástica), a la edad del paciente, comorbilidades al momento del diagnóstico de la enfermedad, estratificación de los pacientes por riesgo y algunos otros factores pronóstico. Sin embargo, de manera convencional el tratamiento de primera línea para las leucemias durante las últimas décadas ha sido la quimioterapia. Esta consiste en la administración de fármacos citotóxicos o citostáticos en células cancerosas, que pueden ser administrados por vía oral, tópica, intravenosa o por vía parenteral, de acuerdo al tipo de cáncer y al estadio en el que se encuentre la enfermedad (NIH, 2022).

Los quimioterapéuticos utilizados para tratar las leucemias incluyen: agentes alquilantes, interfieren con el DNA e impiden la reparación y división celular, estos se pueden dividir en tres grupos, alquilantes clásicos (ej. ciclofosfamida, clorambucilo), nitrosoureas (ej. carmustina, estramustina) y tetrazinas (ej. dacarbacina, temozolomida); fármacos antimetabolitos, que interfieren con el DNA y RNA sustituyendo las moléculas para formarlos, por lo que se impide su síntesis y por tanto la duplicación celular, en esta categoría se incluyen fármacos como los análogos de pirimidina (citarabina o Ara-C), análogos de purina (mercaptipurina) y los análogos del ácido fólico (metotrexato), análogos de nucleósidos de citidina (azacitidina), por mencionar algunos. Además, están los inhibidores

de la topoisomerasa (ej. irinotecán, etopósido VP-16) que inhiben las enzimas topoisomerasas impidiendo la separación de la doble hebra de DNA y por tanto su replicación; antraciclinas o antibióticos antitumorales, interfieren con las enzimas involucradas en la replicación del DNA durante el ciclo celular (ej. daunorubicina, doxorubicina, idarrubicina); e inhibidores de la mitosis, estos fármacos detienen la división celular a través de la inhibición de enzimas necesarias para dicho proceso (ej. vincristina, docetaxel) (Asano, 2020) (American Cancer Society, 2022).

Generalmente estos medicamentos se usan en combinación para el tratamiento de las leucemias. En este documento se describirán dos regímenes convencionales para el tratamiento de los dos principales tipos de leucemia, la LMA que es la leucemia más común en adultos, y la LLA que es la leucemia más común en niños.

La LMA se ha tratado convencionalmente con una combinación del quimioterapéutico citarabina y una antraciclina, ya sea daunorubicina o idarrubicina, en un régimen denominado “3 + 7”, en el que se administran 3 días de antraciclina seguidos de 7 días de citarabina. Este tratamiento es usualmente recomendado para los pacientes con riesgo bajo; sin embargo, para aquellos que tienen malos pronósticos o riesgo alto se ofrecen otras alternativas (Kadia *et al.*, 2016). Por su parte, la LLA en niños es tratada convencionalmente con una fase de inducción en la que se administran como quimioterapéutico vincristina, un corticoesteroide (dexametasona o prednisona), L-asparaginasa (citostático) con o sin un antraciclina, luego de esta combinación se continúa con un régimen de consolidación que incluye altas dosis de metotrexato, además de terapia de reinducción, y finalmente se requiere terapia de mantenimiento (menos invasiva) durante 1 a 2 años para asegurar la supervivencia libre de células leucémicas (Kato & Manabe, 2018). La quimioterapia presenta diversos efectos secundarios en los pacientes que pueden ser leves a moderados como: cansancio, caída del cabello, náuseas, vómito, diarrea, cambios de apetito, estreñimiento, tendencia a presentar moretones y sangrados leves, anemia, úlceras, entumecimiento, cambios de peso; hasta efectos graves que incluso pueden ser letales como: problemas renales, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, infecciones o incluso carcinogénesis secundaria a la del inicio del tratamiento (American Cancer Society, 2022).

Algunos tratamientos o alternativas que se utilizan hasta el momento en las leucemias son: terapia dirigida, terapia con células T-CAR, trasplante de médula ósea y terapia epigenética.

La terapia dirigida se centra en las alteraciones citogenéticas (cromosómicas) de las leucemias, así como en alteraciones específicas en los diversos tipos de leucemias. Estas terapias abarcan: los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) (actúan sobre los receptores de superficie celular que es anormal en las células leucémicas), inhibidores de puntos de control inmunitario, anticuerpos monoclonales contra los linfocitos T o bioespecíficos, agentes metabólicos y proapoptóticos (Kayser & Levis, 2028). Un ejemplo muy representativo es el imatinib, que es un TKI utilizado en la LMC con t(9;22) o cromosoma filadelfia, la translocación produce una proteína de fusión denominada BCR-ABL que es una tirosina cinasa que se mantiene activa provocando una alteración permanente en la proliferación celular (Claudiani & Apperley, 2018). Otro ejemplo se presenta en el tratamiento para la LLC, este tipo de leucemia generalmente se presenta en adultos de edad avanzada, en los que las comorbilidades son recurrentes y muchas veces esto no los hace candidatos a la quimioterapia. Otro caso es el de pacientes con este mismo tipo de leucemia que entran en recaída, en estos casos puede usarse una combinación de dos terapias dirigidas, rituximab, que es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD20 en la superficie de linfocitos B, esta unión permite el reconocimiento por parte de los efectores de la respuesta inmune para mediar la eliminación de las células leucémicas. El tratamiento con este anticuerpo se acompaña con ibrutinib que es un TKI de Bruton, que es una molécula clave en la señalización de un receptor de células B que estimula el crecimiento y la división celular (Morabito *et al.*, 2021).

La terapia con células CAR-T ha revolucionado el tratamiento para las neoplasias malignas de células B, incluidas la LLA-B y la LLC en las que se han logrado tasas de remisión altas (70 al 94%). El procedimiento consiste en la extracción de los linfocitos T de los pacientes para su posterior modificación genética (inserción génica) que les permita expresar el receptor de antígeno quimérico CAR (Chimeric Antigen Receptor), estas células son capaces de activarse independientemente del complejo mayor de histocompatibilidad (HMC) y reconocer las células leucémicas para destruirlas. Los resultados de esta terapia ha sido

menos alentadora para los tumores sólidos y quedan todavía múltiples desafíos como la recaída de los pacientes y la toxicidad en tejidos sanos (Ahmad, 2020; Wang *et al.*, 2017).

El trasplante de médula ósea puede ser otra opción para los pacientes con leucemia. Este puede ser autólogo, es decir, una trasfusión de las propias células, o alogénico, es decir, que las células del trasplante provengan de un donador ajeno. En ambos casos, antes del procedimiento se lleva un régimen de dosis altas de quimioterapia que tiene dos propósitos: en el trasplante alogénico, la citorreducción, inmunosupresión y teóricamente, un “nuevo espacio” para el trasplante; y en el caso del trasplante autólogo, sirve principalmente para erradicar las células malignas. Este tipo de procedimiento se convierte en una alternativa para los pacientes que no pueden recibir dosis altas de quimioterapia sin poner en riesgo su vida por los efectos secundarios (infecciones, sangrado) o por las comorbilidades, también pueden ser candidatos los pacientes en recaída o como una terapia de consolidación. Sin embargo, también presentan desventajas significativas: el autoinjerto puede presentar contaminación con células leucémicas que hagan que el paciente recaiga, también se pueden presentar infecciones, hemorragias, enfermedad del injerto contra el huésped, en el caso del trasplante alogénico, fracaso del injerto, entre otros (Imrie *et al.*, 1996).

Finalmente, los fármacos epigenéticos van dirigidos a restaurar el paisaje epigenético “normal”. Hasta el momento, estos fármacos van dirigidos a la inhibición de las enzimas modificadoras de histonas y de DNA. Se cuentan con algunos fármacos epigenéticos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) (Tabla 3) para el tratamiento de diversas neoplasias malignas, en la que están incluidas las leucemias, y existen muchos más fármacos epigenéticos en ensayos clínicos para ser aprobados. Los fármacos aprobados están incluidos en 3 categorías: inhibidores de HDACs (iHDAC), inhibidores de DNMTs (iDNMT) e inhibidor de una histona lisina metiltransferasa (iEZH2) (Nepali & Liou, 2021). En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de ellos y de uso en las leucemias.

La terapia epigenética por si sola puede inducir la muerte de las células leucémicas; sin embargo, la toxicidad de dichos fármacos se asemeja a la de la quimioterapia convencional.

El uso de dosis menores conserva el efecto epigenético, disminuyendo la toxicidad de los mismos, aunque hasta el momento, el uso individual de dicha terapia no ha logrado los resultados esperados. Y si bien, el uso combinado de la terapia epigenética con otros agentes aún tiene resultados contrastantes, la combinación con la quimioterapia, la inmunoterapia o incluso el uso combinado de terapia epigenética, ha logrado disminuir la resistencia a los tratamientos convencionales, generar un sinergismo entre los fármacos, la posibilidad de tratamiento para pacientes que no son candidatos a la quimioterapia y de acuerdo a la dosificación, la reducción de efectos adversos. Por ejemplo, se han utilizado combinaciones de decitabina y vorinostat con quimioterapia en pacientes infantiles con LLA refractaria, en la que los pacientes vuelven a responder al tratamiento (Burke *et al.*, 2020). Otro ejemplo, el uso de azacitidina para la LMA en adultos que no pueden someterse a regímenes de tratamiento intensivo como una alternativa de tratamiento (Schuh *et al.*, 2017). La terapia epigenética aún sigue en estudio, la variación epigenética entre los distintos tipos de cáncer o incluso entre cada individuo puede ser esencial para el desarrollo de fármacos y estrategias terapéuticas en las leucemias. Una de las grandes ventajas con las que cuenta la epigenética es que a diferencia de las mutaciones genéticas, las alteraciones epigenéticas son reversibles, y esto abre la posibilidad de reprogramar el epigenoma modificado en el cáncer (Miranda-Furtado *et al.*, 2019).

Tabla 3. Fármacos epigenéticos aprobados por la FDA para su uso en diversas neoplasias hematológicas. Se muestra en que tipo específico de leucemias han sido probadas. NP: no probado.

	Fármacos epigenéticos	Uso en leucemia	Referencia
iHDACs	Vorinostat	LMA LLA infantil en recaída	Prebet & Vey, 2011 Burke <i>et al.</i> , 2020
	Panobinostat	LMA	Karol <i>et al.</i> , 2020
	Romidepsina	LLA-T refractaria LLC	Brunvand & Carson, 2018 Lemchak & Akilov, 2016
iDNMT	5-azacitidina	LMA	Schuh <i>et al.</i> , 2017
	Decitabina	LMA LLA infantil en recaída	Nepali & Liou, 2021 Burke <i>et al.</i> , 2020
iEZH2	Tazemetostat	NP	Nepali & Liou, 2021

1.2. Péptidos Antimicrobianos

1.2.1. Características y estructura

Los péptidos antimicrobianos (Antimicrobial Peptides o AMP) son moléculas biológicamente activas producidas por una amplia variedad de organismos como un componente esencial de su respuesta inmune innata. Estos péptidos proporcionan protección contra bacterias, hongos, parásitos y virus (Hafeez *et al.*, 2021). Hasta el momento, se han descrito 3324 péptidos de diversos orígenes: bacterias (391), arqueas (5), protistas (8), hongos (22), plantas (364) y animales (2446), incluidos algunos péptidos sintéticos, a los que se les han descrito actividades adicionales como: antiinflamatorios, anticancerosos, antidiabéticos, antimalaria, antitoxina, entre otros (antimicrobial peptides database, <https://aps.unmc.edu/>). Su tamaño oscila entre los 5 y los 100 aminoácidos, principalmente son catiónicos (cargas de +2 a +11) por su rico contenido de argininas y lisinas, tienen una proporción de alrededor del 50% de residuos hidrofóbicos, aunque también contienen residuos hidrofílicos, lo que los hace anfipáticos (Hafeez *et al.*, 2021).

De acuerdo a su estructura secundaria, los AMPs se pueden clasificar como: 1) α -hélice, las hélices suelen ser ricas en Leu, Ala, Gly y Lys y se destacan por ser los más abundantes en la naturaleza; 2) β -lámina, contienen al menos dos cadenas β con segmentos lineales que adoptan una conformación similar a una horquilla. La mayoría contienen residuos de cisteína que les permite formar puentes disulfuro y su estructura es rica en Leu, Ala, Gly y Lys; 3) $\alpha\beta$, formados tanto por hélices α como por láminas β ; y 4) no- $\alpha\beta$, sin estructura de α -hélice y β -lámina, también son denominados péptidos lineales o de bucle y tienen un contenido de aminoácidos rico en Pro y Gly (Fig. 8). Además de los englobados en esta clasificación los AMP también pueden ser cíclicos (Hafeez *et al.*, 2021).

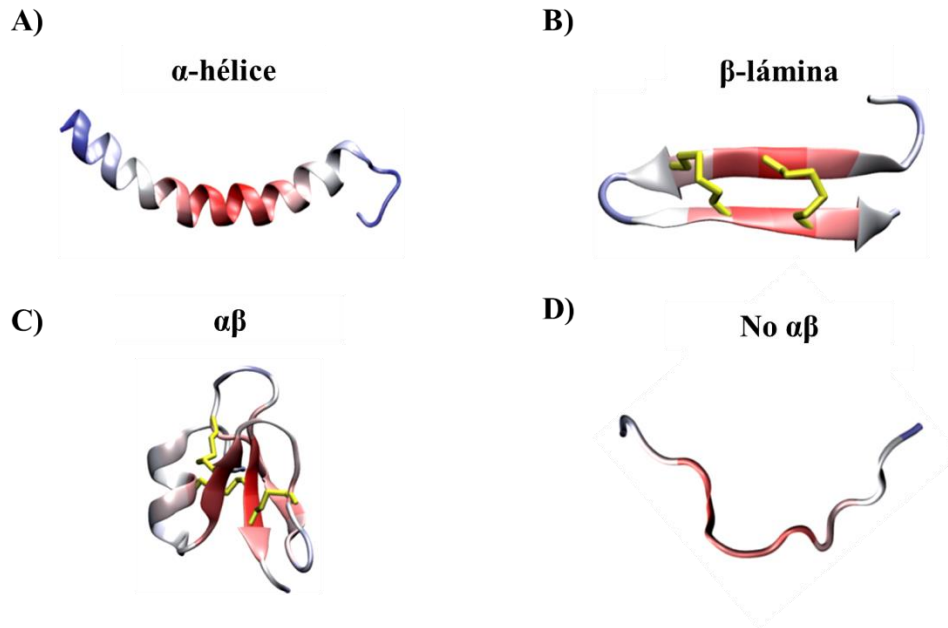


Figura 8. Representación de la clasificación de los AMPs según su estructura secundaria. A) α -hélice (ejemplo: péptido LL-37), B) β -lámina (ejemplo: péptido protegrina-1), C) $\alpha\beta$ (ejemplo: β defensina 2 humana) y C) no $\alpha\beta$ (ejemplo: indolicina). Tomado de: Zhang *et al* (2014).

1.2.2. Mecanismo de acción

En cuanto a su mecanismo de acción se asume que los AMPs interaccionan con la membrana celular, y dependiendo del efecto sobre la misma, éstos pueden ser clasificados como: permeabilizadores y no permeabilizadores. Entre los mecanismos permeabilizantes se encuentra:

- 1) El modelo de barril, en este los péptidos se agregan en la superficie de la membrana, se insertan y se orientan de manera vertical de tal manera que sus cadenas laterales no polares se dirigen al núcleo lipídico hidrofóbico de la membrana, y las superficies hidrofílicas de los péptidos apuntan hacia adentro y forman poros transmembrana que liberan el contenido intracelular y consecuentemente la muerte de la célula (Fig. 9A); ej. las magaininas y bacteriocinas.
- 2) En el modelo de alfombra, los péptidos inicialmente se asocian en la superficie de la membrana y forman una “alfombra” local, los extremos hidrofóbicos entran en contacto con la membrana y los hidrofílicos con el espacio extracelular. Una vez que se alcanzó una concentración umbral particular, el péptido se introduce en la

membrana y provoca la lisis celular (Fig. 9B); ej. de este mecanismo están las cecropinas y la indolicina.

- 3) En el modelo del poro toroidal, los péptidos agregados a la superficie de la membrana inducen despolarización de la membrana y forman un poro transmembrana que conduce a la muerte celular, durante la formación del poro las regiones polares de los péptidos se alinean con las partes polares de lípidos (Fig. 9C); ej. de este mecanismo: la lacticina, tripticina y pleurocidina.
- 4) Otro mecanismo es el “modelo de electroporación”, en él se propone la formación de poros bajo la influencia de un campo eléctrico, esto solo ocurrirá cuando los péptidos tienen una densidad de carga suficiente para generar un campo eléctrico que permita la formación de poros en la membrana celular (Fig. 9D); ej. la polimixina B y la melitina (Hafeez *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2012).

Los AMPs no ejercen su función únicamente sobre la membrana celular, son capaces de traspasarla, acumularse internamente y unirse a un objetivo intracelular. Los modelos propuestos para la internalización de los AMPs no permeabilizantes son: “modelo de agregado”, en él los AMPs se unen a las cabezas de los fosfolípidos, se agrupan y forman agregados micelares transitorios que contienen agua, estos agregados permiten la translocación del péptido través de la membrana. Este modelo propone que los péptidos forman grupos transmembrana de corta duración, lo que permite que los péptidos atraviesen sin causar una despolarización significativa que cause lisis celular; y el “modelo de balsa de hundimiento”, se propone que hay un desequilibrio de la proporción de masa por la preferencia de unión a un dominio lipídico particular de la membrana, este desequilibrio genera una desproporción que lleva a la translocación del péptido a través de un aumento en la curvatura de la membrana localmente (Fig. 9E). Se cree que los AMPs no están estructurados en solución y adquieren una conformación plegada anfipática al interactuar con las membranas biológicas. Esta interacción es mediada por una atracción electrostática (Teixeira *et al.*, 2012).

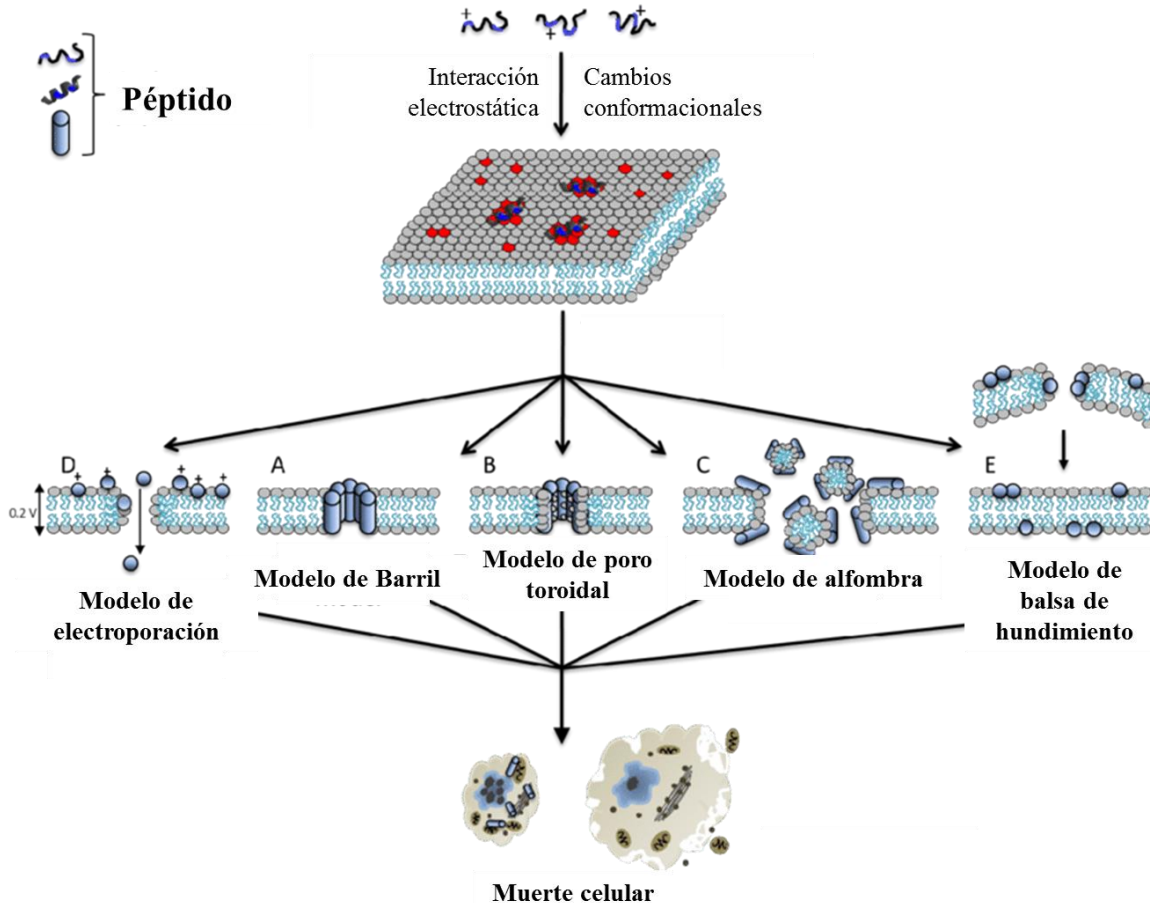


Figura 9. Mecanismo de acción permeabilizante y no permeabilizante sobre la membrana celular de AMPs. A) modelo de barril, B) modelo de alfombra, C) modelo de poro toroidal, D) modelo de electroporación y E) modelo de balsa de hundimiento. Las descripciones e la imagen se encuentran en el texto. Las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas de los AMP están representadas en azul y rojo, respectivamente. La cabeza hidrofílica y la cola hidrofóbica están representadas en cian y naranja, respectivamente. Imagen modificada de Camilio (2013).

1.3. Péptidos antimicrobianos de plantas

Los AMPs de plantas juegan un papel fundamental en la defensa de las plantas contra patógenos. La mayoría tiene un peso molecular entre 2 y 10 kDa, son principalmente básicos y ricos en cisteínas (de 4 a 12), con las que forman puentes disulfuro que les permiten estabilizar su estructura y termodinámica. Son producidos en raíces, semillas, flores, tallos y hojas de diversas especies; se expresan de manera constitutiva o son inducidos por la respuesta al ataque de patógenos (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015).

Su clasificación está basada en la identidad de su secuencia de aminoácidos, el número y posición de sus cisteínas y en general por sus estructuras terciarias (Tabla 4). Sus principales funciones en las plantas son antibacterianas y antifúngicas, aunque también tienen funciones de tolerancia a metales pesados, estrés abiótico y en el desarrollo de la planta (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015; Nawrot *et al.*, 2014).

Tabla 4. Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas. Adaptado de Guzmán-Rodríguez *et al.* (2015).

Familia	Puentes disulfuro	Actividad
Defensinas	3-4	Bacterias y hongos
Tioninas	3-4	Bacterias y hongos
Ciclótidos	3	Bacterias, virus, insectos
Knottin-like	3	Bacterias gram(+) y hongos
Shepherdins	0 (lineal)	Bacterias y hongos
MBP-1	2	Bacterias y hongos
Ib-AMPs	2	Bacterias gram(+) y hongos
LTP	3-4	Bacterias y hongos
Esnaquina	6	Bacterias y hongos
Hevein-like	4	Bacterias gram(+) y hongos
β -Barrelinas	6	Hongos
2S albuminas	2	Bacterias y hongos

1.3.1. Defensinas de plantas

1.3.1.1. Características y estructura

Las defensinas de plantas son una familia de péptidos catiónicos que contienen de 45 a 54 residuos aminoacídicos. Estas se expresan en diferentes partes de la planta como hojas, semillas, flores, raíces, y frutos. Su expresión es inducida por el ataque de patógenos, heridas y estrés abiótico. Su principal actividad es antifúngica; sin embargo, tienen actividad antibacteriana y antiviral. Su estructura consta de un alfa-hélice, 3 láminas beta antiparalelas, dispuestos en la configuración $\beta\alpha\beta\beta$, contienen 8 cisteínas que les permite formar 4 puentes

disulfuro para estabilizar la estructura (Fig. 10A). Las defensinas de plantas se han clasificado por su estructura y la topología de sus puentes disulfuro como cis-defensinas, debido a los dos puentes disulfuro paralelos que unen la cadena β final (β_3) a la hélice α (Fig. 10A) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015; Kovaleva *et al.*, 2020).

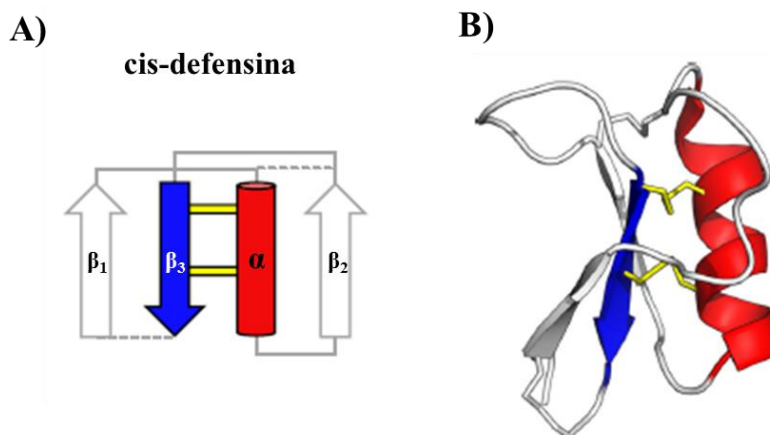


Figura 10. Clasificación de las defensinas de acuerdo a su estructura secundaria. A) Esquema de la estructura cis de una defensina. B) Esquema tridimensional de una defensina y su conformación cis, en específico se muestra la defensina NaD1. En ambos casos, en azul y blanco se esquematizan las láminas β , mientras que en rojo se muestran las hélices α . Adaptado de Shafee *et al* (2017).

Las defensinas de plantas tienen una identidad de secuencia que varía de menos del 35% a más del 90%. Los cisteínas que forman los ocho puentes disulfuro están conservados en las defensinas (C1 a C8). El número de residuos aminoacídicos entre las cisteínas C1 a C3 y C4 a C6 cambia de 3 hasta 10 aminoácidos, mientras que el número de residuos de aminoácidos entre otras cisteínas se mantiene en 3, 1 y 3: C3-xxx-C4, C6 -x-C7 y C7-xxx-C8, donde x denota cualquier aminoácido. Así, los puentes disulfuro tienen el siguiente patrón en la cadena aminoacídica: C1-C8, C2-C5, C3-C6 y C4-C7 (Fig. 11). Existen algunas excepciones al número de puentes disulfuro, por ejemplo, la defensina PhD1 posee 10 residuos de cisteína para formar 5 puentes disulfuro (Kovaleva *et al.*, 2020).

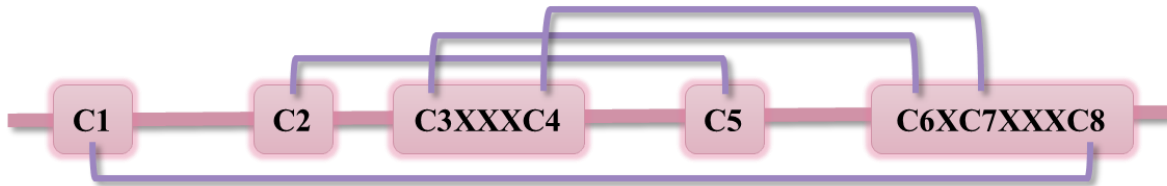


Figura 11. Representación esquemática de los puentes disulfuro de las defensinas de plantas.

Las letras C indican las cisteínas en la estructura. El número conservado de aminoácidos (X: cualquier aminoácido) separa las cisteínas 3 y 4 (tres aminoácidos), 6 y 7 (un aminoácido) y 7 y 8 (tres aminoácidos). Las líneas continuas en morado indican las formaciones de los puentes disulfuro. Adaptado de: Kovaleva *et al* (2020).

1.3.1.2. Clasificación

Las defensinas de las plantas además, se dividen en las clases I y II (Fig. 12). Estas clases están definidas por la estructura de sus precursores. Las defensinas de clase I contienen una secuencia señal del retículo endoplasmático (RE) y un dominio de defensina maduro. Estas defensinas son dirigidas a la vía secretora y se acumulan en las paredes celulares y el espacio extracelular. Por el contrario, las defensinas de clase II se producen a partir de precursores más grandes con una secuencia señal de RE, junto con un dominio de defensina maduro y un pro-dominio C-terminal que las dirige hacia la vacuola. En la vacuola se procesan proteolíticamente para liberar la defensina madura y se almacenan. La mayoría de las defensinas de clase II son producidas por especies solanáceas, donde se expresan en tejidos florales y frutos (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015).

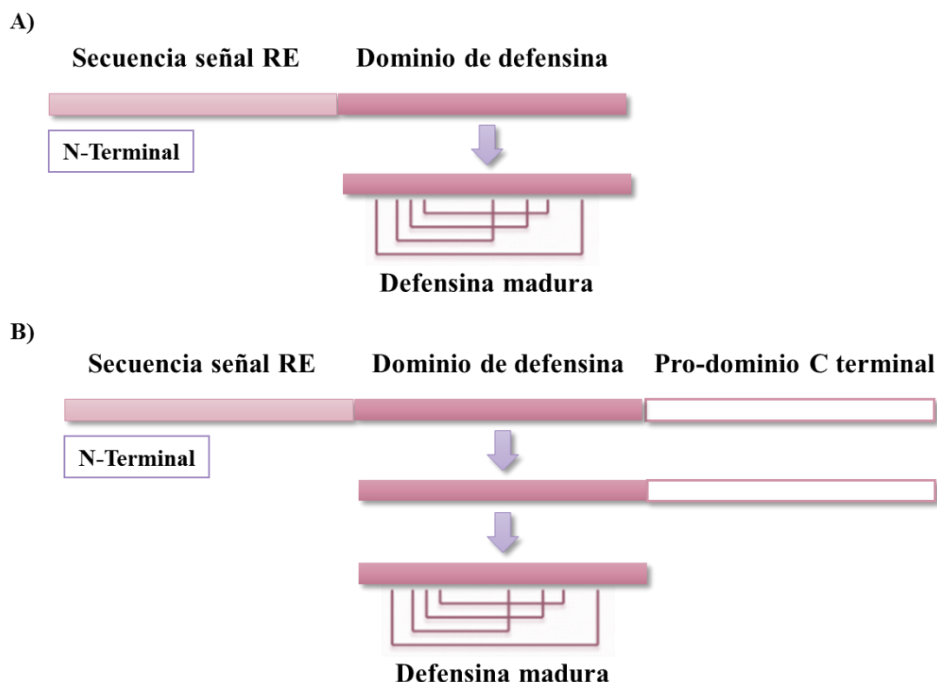


Figura 12. Clases de defensinas de plantas. A) Defensinas de clase I, B) Defensinas de clase II. Las barras en diferentes tonalidades de rosa representan las secuencias de los dominios que dan origen a las dos clases de defensinas, al final de cada una, en la esquematización de la defensina madura se muestran los puentes disulfuro. Adaptada de Lay & Anderson (2005).

1.3.1.3. Actividad biológica y citotóxica

El papel de las defensinas de plantas en la protección contra patógenos es principalmente antifúngica (como se describió anteriormente); sin embargo, participan también como antibacterianos, antivirales, insecticidas, en el desarrollo de la tolerancia a los metales, y pueden incluso jugar un papel en la reproducción de la planta (Ishaq *et al.*, 2019). Por otra parte, se han descrito otras actividades biológicas para los diversos AMPs que las pone como un foco atractivo en la búsqueda de moléculas naturales con potencial medicinal. Se han descrito diversas defensinas vegetales con actividad citotóxica y anticancerosa en diversas líneas celulares. Por ejemplo, la sesquina (*Vigna sesquipedalis*) posee actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama MCF-7 y de leucemia M1 (Wong & Ng, 2005), esta fue la primera descripción de una defensina con actividad anticancerosa. Un año después, Wong & Ng demostraron el efecto citotóxico de la defensina lunatusina (*Phaseolus*

lunatus), ésta suprime la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MCF-7; sin embargo, esta defensina también es citotóxica hacia células normales. Más tarde, se describieron defensinas que tienen actividad citotóxica en células cancerosas pero no en células normales, entre ellas una defensina de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que suprime el crecimiento de células MCF-7, HepG2, HT-29 y Sila (Lin *et al.*, 2009). Así como la defensina PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), que es citotóxica para células de cáncer de mama MCF-7 y de leucemia (K-562 y Jurkat) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Álvarez *et al.*, 2018). Además, se han descrito mecanismos específicos de citotoxicidad de las defensinas como: necrosis, este es el caso de la defensina NaD1 (*Nicotiana glauca*), probado en células de melanoma (MM170) y de leucemia (Jurkat) (Poon *et al.*, 2014). Otro mecanismo descrito es el de apoptosis con defensinas como la γ -tionina en células de cáncer de mama MCF-7 y la defensina PaDef en células de leucemia K-562 y Jurkat (Guzmán-Rodríguez *et al.* 2016; Flores-Álvarez *et al.*, 2018). Por otra parte, se han descrito otros mecanismos de citotoxicidad en defensinas humanas, entre ellos: FK-16, un fragmento de la defensina humana LL-37, induce autofagia en células de cáncer de colón (Ren *et al.*, 2013); y la β -defensina humana 2, cuyo efecto es dependiente de la concentración, suprime la proliferación celular mediante un arresto del ciclo celular en la fase G1/S, esto fue probado en las líneas celulares cancerosas A549 y A431 (Zhuravel *et al.*, 2011). Adicionalmente, se sabe que las defensinas vegetales pueden tener un efecto sinérgico con los quimioterapéuticos, tal es el caso de la defensina γ -tionina, utilizada en combinación con butirato de sodio (NaB) en células Caco2, en la que se demostró que el uso combinado puede tener un efecto de sinergismo (Velázquez-Hernández *et al.*, 2021).

1.4. Apoptosis

1.4.1. Definición y características

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su muerte en respuesta a determinados estímulos. De manera natural, la apoptosis puede ocurrir durante el desarrollo, envejecimiento de las células y para mantener la homeostasis de las poblaciones de células en los tejidos. Adicionalmente, la

apoptosis puede ocurrir en respuesta al daño celular provocado por enfermedades (ej. células neoplásicas), por agentes tóxicos o radiación (Elmore, 2007; Pistritto *et al.*, 2016).

En la muerte celular por apoptosis, la célula “empaqueta” su contenido citoplasmático, evitando así que se produzca una respuesta inflamatoria (característica de la muerte por necrosis). En lugar de lisarse y, por lo tanto, derramar su contenido intracelular enzimático hacia el espacio intercelular, las células apoptóticas se encogen y se fragmentan formando vesículas pequeñas que contienen el material celular. De esta manera, pueden ser eficientemente fagocitadas y, consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente.

1.4.2. Etapas de la apoptosis

El proceso de apoptosis se desarrolla en tres etapas: 1) inducción, 2) ejecución y 3) formación de cuerpos apoptóticos. La inducción de apoptosis se activa mediante un estímulo o señal, que puede ser extracelular (mediada por receptores) o procedente de la propia célula (pérdida de potencial de membrana mitocondrial) (véase activación de la apoptosis). Algunos estímulos que pueden desencadenar la inducción son: supresión de factores de crecimiento, daño al DNA que no es susceptible de repararse, la unión de ligandos como CD95L (también conocido como FasL) y el factor de necrosis tumoral (TNF) a sus receptores CD95 (Fas) y TNFR, respectivamente. La ejecución resulta de las diferentes alteraciones que conducen a la muerte de la célula, entre ellas se puede mencionar la contracción del citoplasma, la pérdida de la organización de la membrana plasmática (la fosfatidilserina se transloca al exterior de la célula), condensación de la cromatina que deriva en la fragmentación del DNA y la pérdida de la adhesión celular. Estas alteraciones son resultado de la acción de caspasas y nucleasas. En la última fase, la formación de cuerpos apoptóticos, la célula se destruye sin liberar su contenido al medio extracelular y los cuerpos apoptóticos que se forman son reconocidos y fagocitados por macrófagos o granulocitos (Fig. 13) (Chmurska *et al.*, 2021).

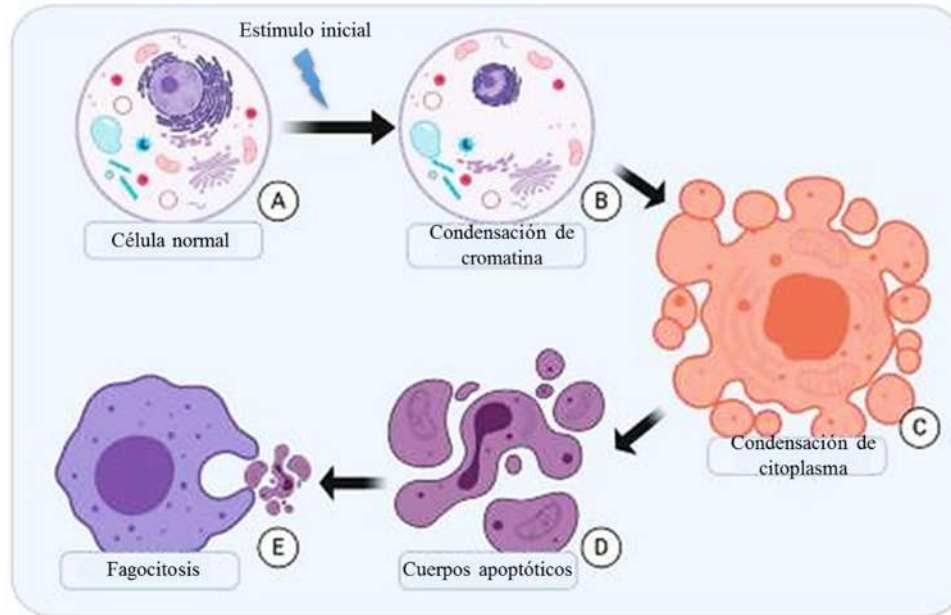


Figura 13. Etapas de la apoptosis. A) Un estímulo inicial (extrínseco o intrínseco) desencadena el inicio de la apoptosis. B) Condensación de la cromatina, el núcleo se contrae y luego se fragmenta.

C) Condensación del citoplasma, se crean burbujas características del proceso en la superficie celular. D) Formación de cuerpos apoptóticos que contienen fragmentos celulares de orgánulos, citoplasma y cromatina. E) Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por parte de los macrófagos.

Tomada de: Chmurska *et al* (2021).

1.4.3. Vías de inducción de la apoptosis

Existen dos rutas principales a través de las cuales se puede inducir la apoptosis en la célula:

1) la ruta de receptores de muerte o ruta extrínseca, y 2) la ruta mitocondrial o ruta intrínseca.

Ambas vías están vinculadas y pueden influirse mutuamente.

1.4.3.1. Vía de receptores de muerte o vía extrínseca

La vía extrínseca o de receptores de muerte recibe señales proapoptóticas desde el exterior y de las células circundantes. En este proceso se involucran los receptores de la súper familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), con sus respectivos ligandos de la familia de proteínas TNF. Los complejos de receptor-ligando incluyen: TNFR1-TNF α , FAS (CD95, APO-1)-FasL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL y TRAILR2 (DR5)-TRAIL. Estos receptores tienen un dominio intracelular denominado dominio de muerte (DD), que induce la señalización de la apoptosis. La unión del ligando con su respectivo receptor genera

cambios conformacionales que revelan el DD citoplasmático que se une a las proteínas adaptadoras (FADD/TRADD), que a su vez secuestran las pro-caspasas 8 y 10 (características e iniciadoras de la ruta extrínseca) formando un complejo (denominado DISC cuando el complejo es FASR/FasL), este complejo aumenta la concentración local de pro-caspasas y promueve la activación de las caspasas 8 y 10 a través de su escisión. La activación de las caspasas iniciadoras da como resultado la activación (escisión) de las caspasas ejecutoras: caspasas 3, 6 y 7. La señal de activación de caspasas ejecutoras se propaga por el citoplasma y comienzan los cambios conformacionales característicos de la célula en la fase de ejecución de la apoptosis; se activan enzimas hidrolíticas como proteasas y nucleasas que ayudan a la desintegración de las estructuras celulares, se inactivan sistemas de reparación celular y se generan cambios como la fragmentación del DNA. En esta misma ruta las caspasas 8 y 10 pueden activar a otra proteína denominada BID, que posteriormente activa a las moléculas Bax y Bak, efectores de la ruta intrínseca de la apoptosis, momento en que convergen ambas vías de la apoptosis (Fig. 14) (Chmurska *et al.*, 2021; Opdenbosch & Lamkanfi, 2019; Pistritto *et al.*, 2016).

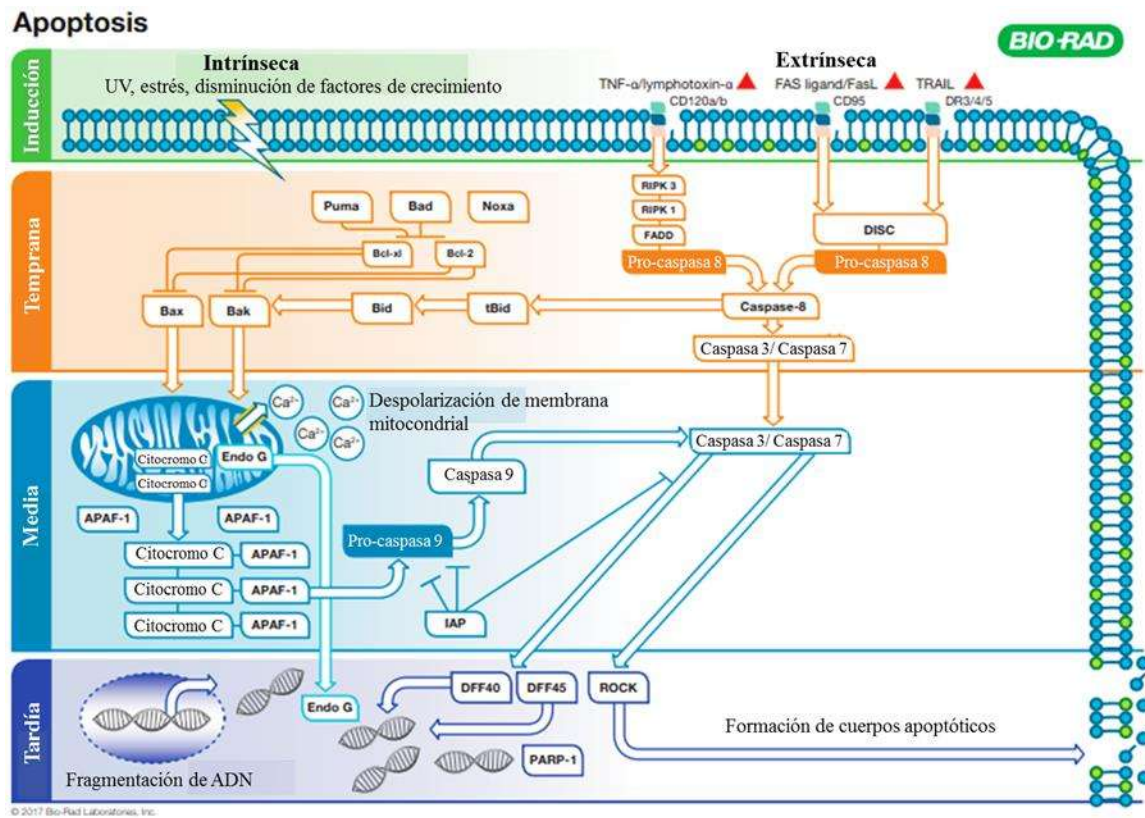


Figura 14. Vías de inducción de la apoptosis. Del lado izquierdo se muestra la ruta intrínseca de la apoptosis activada a través de la despolarización de la membrana mitocondrial. Por su parte, del lado derecho se observa la vía extrínseca de la apoptosis activada por los receptores de muerte.

Obtenido de: BIORAD.

1.4.3.2. Vía mitocondrial o intrínseca

La vía de inducción mitocondrial o intrínseca puede desencadenarse como resultado de un incremento en la concentración de iones calcio (Ca^{2+}), especies reactivas de oxígeno (ROS), hipoxia, déficit hormonal y de factores de crecimiento. Las proteínas de la familia de Bcl-2, en especial Bax y Bak, neutralizan a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1, regulando así la inducción de esta vía de apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 producen un poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) que permite la liberación de proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c. Una vez en el citoplasma, el citocromo c se une a un factor proteínico denominado Apaf-1 (factor activador de la proteasa de la apoptosis-1) y a la pro-caspasa 9 para formar un complejo denominado “apoptosoma”. El apoptosoma permite la escisión de la pro-caspasa 9 para convertirla en una caspasa activa. Una vez activada, la caspasa-9 escinde las caspasas efectoras; la caspasa 3 y 7 activándolas, esto desencadena la fase efectora de la apoptosis antes descrita. Además del citocromo c, se liberan diversas proteínas como el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G, que se translocan al núcleo y participan en la compactación de la cromatina (Fig. 14) (Chmurska *et al.*, 2021; Pistritto *et al.*, 2016). Por otro lado, la proteína SMAC (pequeño activador de caspasas derivado de la mitocondria) se une a la proteína IAP (inhibidor de apoptosis) para desactivarlo, esta unión ocurre luego de su liberación al citoplasma. Otros inhibidores posibles de IAP son DIABLO y Omi (Xu *et al.*, 2019).

3.4.3.3. Efectores de apoptosis

Las caspasas son proteasas de cisteína que participan en el inicio y ejecución de la apoptosis. Estas proteínas contienen un dominio amino-terminal seguidas de subunidades catalíticas grandes y pequeñas que juntas forman el dominio proteasas. En cuanto a su actividad, las caspasas son proteasas específicas que escinden en un residuo aminoacídico de Asp o Glu.

De acuerdo a la función que realizan en el proceso de apoptosis, las caspasas se han clasificado como: caspasas iniciadoras, a la caspasa 8 (vía extrínseca) y la caspasa 9 (vía intrínseca), aunque existen más en esta categoría (caspasa 2, 10 y 11); y las caspasas efectoras que son las caspasas 3, 6 y 7. Todas las caspasas se producen como zimógenos catalíticamente inactivos y deben sufrir una proteólisis para ser activadas. Las caspasas efectoras se activan a través de las caspasas iniciadoras, por su parte, las caspasas iniciadoras se autoactivan generalmente al estar asociadas a un complejo proteínico (ej. caspasa 8 a DISC y caspasa 9 a apoptosoma). Los sustratos celulares conocidos de las caspasas ejecutoras incluyen: componentes estructurales (actina, lámina nuclear), proteínas reguladoras (quinasas dependientes de DNA), inhibidores de desoxirribonucleasa y otras proteínas caspasas para su activación (Opdenbosch & Lamkanfi, 2019; Shi, 2002; Xu *et al.*, 2019).

Otros efectores de apoptosis son la familia de proteínas Bcl-2, que son los responsables de la regulación de la apoptosis. Se clasifican como antiapoptóticos y proapoptóticos de acuerdo a la función que realizan. Esta clasificación también está basada en los dominios que contienen las proteínas. Los miembros antiapoptóticos contienen 4 dominios de homología BH. Por su parte, los miembros proapoptóticos se clasifican en dos familias por la similitud de su secuencia en la forma de dominios BH (homología Bcl-2): los que contienen 3 dominios de homología BH (multidominio) y los que solo poseen el dominio BH3. Estas proteínas contienen también un dominio hidrofóbico C-terminal (TM) que les ayuda a asociarse con la membrana mitocondrial (Parsons & Green, 2010) (Fig. 15).

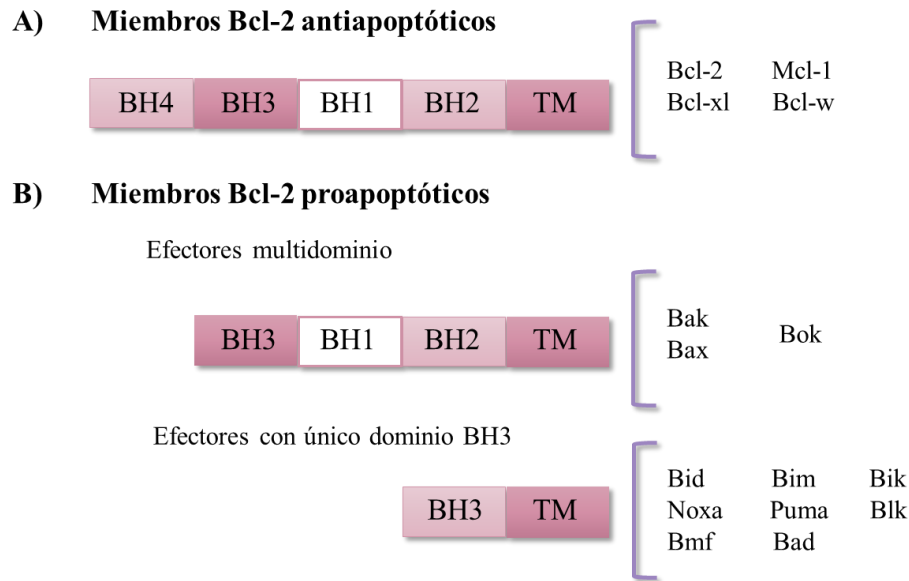


Figura 15. Miembros de la familia Bcl-2. A) miembros antiapoptóticos, B) miembros proapoptóticos. Se ilustran diagramas esquemáticos de los grupos divididos por función (proapoptóticos y antiapoptóticos) así como por el número de dominios que presenta su estructura (BH y TM). Adaptado de: Parsons & Green (2010).

1.4.4. La apoptosis y el cáncer

Las desregulación en la apoptosis (resistencia a la muerte celular) es un sello distintivo del cáncer (véase sección de cáncer). Las alteraciones en la apoptosis participan en el desarrollo y progresión del tumor, pero también, en la resistencia del cáncer las terapias. Las alteraciones en la apoptosis pueden incluir: alteraciones en los receptores de muerte (ej. pérdida de FASR), alteración en la expresión de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas (sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas y regulación a la baja de proteínas proapoptóticas), función reducida de las caspasas o alteraciones en p53. La restauración de las vías apoptóticas es uno de los atractivos en la búsqueda de terapias contra el cáncer (Pistritto *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

Hasta el momento, se han reportado 3324 péptidos, de los cuales 262 (7.8%) tienen actividad citotóxica. En nuestro grupo de trabajo, se han estudiado dos péptidos antimicrobianos con efecto citotóxico, en específico dos defensinas de plantas: γ -tionina, una defensina de chile habanero (*Capsicum chinense*), y PaDef, una defensina de aguacate (*Persea americana* var. *drimifolia*). PaDef presenta actividad citotóxica en células de cáncer de mama (MCF-7) y en células de leucemia mieloide aguda K-562, en ambos casos a través de un proceso de tipo apoptótico. PaDef desencadena la apoptosis intrínseca en las células MCF7, mientras que en la línea K-562 se desencadena la apoptosis a través de la vía extrínseca. Además, se demostró que el efecto citotóxico de PaDef es selectivo, es decir, que el péptido es citotóxico en células cancerosas, pero no en células normales. Esto fue demostrado en células mononucleares de sangre periférica, en la que los tratamientos con PaDef en concentraciones crecientes no afectaron la viabilidad celular (Flores-Álvarez *et al.*, 2018; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016).

En cuanto al efecto citotóxico de la defensina γ -tionina, esta se probó en células de cáncer de mama (MCF-7), en la línea de leucemia mieloide crónica (K-562) y en una línea de leucemia linfóide aguda (Jurkat). Al igual que PaDef, γ -tionina produce la muerte celular a través de un proceso de tipo apoptótico, inducido por la vía intrínseca para MCF-7 y Jurkat, mientras que para K-562 fue a través de un proceso dependiente de calpaínas (Guzmán-Rodríguez, 2016; Flores-Álvarez, 2018). Por otra parte, también se ha probado el efecto combinado de γ -tionina con butirato de sodio (NaB) en células de cáncer de colón (Caco-2), en la que se observó que el efecto combinado del péptido con NaB mejora la actividad citotóxica del ácido graso en dicha línea celular (Velázquez-Hernández *et al.*, 2021). Además, se determinó que la actividad citotóxica de γ -tionina en células de cáncer de mama (MCF-7) está asociada a cambios epigenéticos, se observó que el tratamiento con γ -tionina inhibe la actividad de HDACs y como consecuencia se incrementan los niveles de acetilación de la lisina 9 (K9) en la histona 3 (Arceo-Martínez *et al.*, 2018). Este fue el primer reporte de una defensina de plantas cuyo efecto epigenético se asoció a su actividad citotóxica en células de cáncer.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer sigue siendo un importante problema de salud a nivel mundial. En el 2020, de acuerdo con el GLOBOCAN, se reportaron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial y casi 10 millones de muertes por esta misma causa (Sung *et al.*, 2021). En las leucemias, el reporte para 2020 indica que ubican en el decimoquinto lugar en incidencia de cáncer y el undécimo lugar en mortalidad a nivel mundial. De las muertes observadas por leucemia, más de la mitad (57.56%) se produjeron en pacientes mayores de 60 años. Por otro lado, para la población infantil las leucemias son el cáncer con mayor incidencia en menores de 5 años, con el mayor porcentaje de muertes por cáncer para esta población. El progreso en el tratamiento para las leucemias ha sido considerable, debido a que se ha mejorado la estandarización de los regímenes de quimioterapia, y que se han desarrollado nuevas alternativas para tratar a los pacientes con leucemias; por ejemplo, el desarrollo de terapias dirigidas, el uso de anticuerpos o la terapia epigenética (Du *et al.*, 2022). Sin embargo, no toda la población de pacientes con leucemia es candidata al régimen completo de quimioterapia (sobre todo adultos mayores), esto limita la respuesta a la terapia; además, tanto la quimioterapia, como las terapias usadas hasta el momento, incluidas las terapias epigenéticas, son altamente tóxicas. Otro problema a enfrentar es la resistencia a los tratamientos convencionales, la cual es recurrente en los pacientes con leucemia, esto representa también un obstáculo en la recuperación. Esto indica que la prioridad en la búsqueda de moléculas antileucémicas está en la disminución o eliminación de los efectos tóxicos, así como la búsqueda de moléculas que ayuden a revertir o evitar la resistencia a los fármacos convencionales. Una opción atractiva, es el uso de péptidos antimicrobianos (Madera & Hoskin, 2016). Estos poseen diversas ventajas frente a los tratamientos convencionales: pueden presentar toxicidad selectiva frente a células cancerosas (Flores-Alvarez *et al.*, 2018; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016); otra ventaja es que son menos susceptibles a los mecanismos de resistencia (El Shazely *et al.*, 2020); pueden mejorar la actividad de otras moléculas al usarse en combinación (Velázquez-Hernández *et al.*, 2021); y en algunos casos los mecanismos de muerte que activan son de tipo apoptótico, esto es deseable, ya que evitan los procesos inflamatorios producidos por la lisis celular (Adeyinka & Bashir, 2022). Asimismo, existe un reporte directo de nuestro grupo de trabajo en el que

se determinó que el efecto citotóxico del péptido γ -tionina está asociado a modificaciones epigenéticas globales en la histona 3 (Arceo-Martínez *et al.*, 2018). Esto representa una ventaja ya que las células cancerosas tienen una alta frecuencia de alteraciones epigenéticas, y a diferencia de las mutaciones genéticas, las alteraciones epigenéticas son reversibles, esto implica que las células cancerosas son vulnerables al tratamiento con modificadores epigenéticos. Además, la combinación de fármacos epigenéticos con otras terapias ha surgido como una estrategia atractiva para el tratamiento del cáncer. La combinación de quimioterapia y terapia epigenética ha logrado mejorar la respuesta a la quimioterapia y disminuir la resistencia a los fármacos de la quimioterapia, así como a los fármacos dirigidos; el uso combinado de terapia epigenética genera un efecto sinérgico, y es prometedor en pacientes con leucemia que no son candidatos a la quimioterapia. En la terapia inmunomoduladora se pueden evitar las presentaciones alteradas de antígeno o las respuestas insuficientes de las células T a través del uso combinatorio con terapia epigenética (Feng & De Carvalho, 2022).

De tal forma que, en la búsqueda de alternativas terapéuticas para las leucemias, las moléculas naturales con efectos citotóxicos y epigenéticos en células cancerosas, resultan una atractiva alternativa de estudio. Para tal efecto, un primer acercamiento es determinar si el efecto citotóxico de γ -tionina y PaDef en las líneas de leucemias K-562 y Jurkat está asociado a la regulación de modificaciones epigenéticas en las histonas.

4. HIPÓTESIS

El efecto citotóxico de los péptidos antimicrobianos γ -tionina y PaDef sobre las células de leucemia linfoide aguda Jurkat y de leucemia mieloide crónica K-562, está asociado a modificaciones epigenéticas en la histona 3.

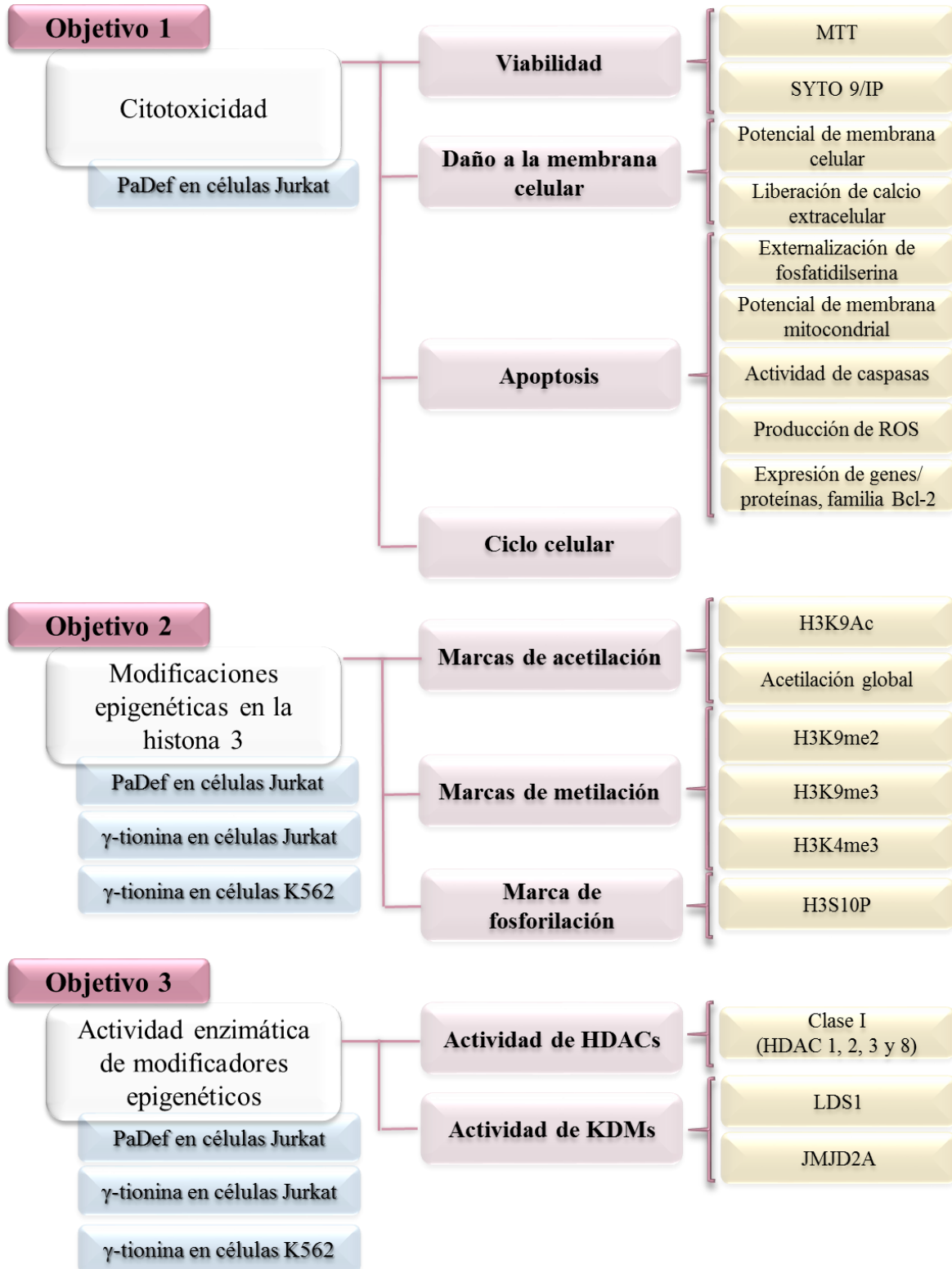
5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las modificaciones epigenéticas asociadas a la actividad citotóxica de los péptidos antimicrobianos γ -tionina y PaDef en las líneas celulares K-562 y Jurkat.

5.1. Objetivos específicos

1. Establecer el mecanismo de acción citotóxico del péptido antimicrobiano PaDef en la línea celular Jurkat.
2. Determinar las modificaciones epigenéticas en la histona 3 que inducen los péptidos γ -tionina y PaDef en las líneas celulares Jurkat y K-562.
3. Analizar los cambios en la actividad enzimática de los modificadores epigenéticos inducidas por los péptidos antimicrobianos γ -tionina y PaDef en las líneas celulares Jurkat y K-562.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

Los se resultados se presentan en 3 capítulos:

- a) **Capítulo 1** corresponde al artículo de investigación original

Jiménez-Alcántar P., López-Gómez R., López-Meza J.E. and Ochoa-Zarzosa A. (2022). PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), a plant antimicrobial peptide, triggers apoptosis, and induces global epigenetic modifications on histone 3 in an acute lymphoid leukemia cell line. *Frontiers in Molecular Bioscience*. 9: 801816. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.801816>

- b) **Capítulo 2** actividad epigenética de γ -tionina en las línea celular K-562 y Jurkat.

Cytotoxic effect of the antimicrobial peptide γ -thionin (*Capsicum chinense*) is associated with global epigenetic modifications in histone 3 in a chronic myeloid leukemia line and an acute lymphoid leukemia cell line.

- c) **Capítulo 3** artículo de divulgación

Jiménez-Alcántar P. & Ochoa-Zarzosa A. (2020) Obesidad: ¿Cómo afecta nuestra salud lo que mamá comió durante el embarazo?. Milenaria Ciencia y Arte. Revista de divulgación de la facultad de salud pública y enfermería de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Año 9, número 15. ISSN: 2395-9436.

7.1. CAPÍTULO 1.

PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), a plant antimicrobial peptide, triggers apoptosis, and induces global epigenetic modifications on histone 3 in an acute lymphoid leukemia cell line



PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), a Plant Antimicrobial Peptide, Triggers Apoptosis, and Induces Global Epigenetic Modifications on Histone 3 in an Acute Lymphoid Leukemia Cell Line

Paola Jiménez-Alcántar¹, Rodolfo López-Gómez², Joel E. López-Meza¹ and Alejandra Ochoa-Zarzosa^{1*}

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico, ²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Lai Yue Angeline Chan,
The University of Queensland,
Australia

Reviewed by:

Bo Liu,
Guangdong Provincial Academy of
Chinese Medical Sciences, China
Dalina Tanyong,
Mahidol University, Thailand

*Correspondence:

Alejandra Ochoa-Zarzosa
ochoaz@umich.mx
alejandra.ochoa@umich.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Protein Biochemistry for Basic and
Applied Sciences,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 25 October 2021

Accepted: 03 January 2022

Published: 24 January 2022

Citation:

Jiménez-Alcántar P, López-Gómez R,
López-Meza JE and Ochoa-Zarzosa A
(2022) PaDef (*Persea americana* var.
drymifolia), a Plant Antimicrobial
Peptide, Triggers Apoptosis, and
Induces Global Epigenetic
Modifications on Histone 3 in an Acute
Lymphoid Leukemia Cell Line.
Front. Mol. Biosci. 9:801816.
doi: 10.3389/fmolb.2022.801816

In recent years, it has been recognized that epigenetic alterations play an important role in the development and maintenance of cancer, including leukemias. Furthermore, it is known that these alterations are involved in the emergence of resistance to conventional chemotherapeutics. Consequently, molecules with an anticancer activity whose activity is ruled by epigenetic modifications are attractive to search for new therapies against cancer. The plant antimicrobial peptides have been widely evaluated as molecules with anticancer activity; however, the analysis of the epigenetic regulation induced by these molecules associated with this activity is scarce and still is an unexplored field. In this work, we show that the PaDef defensin, a plant antimicrobial peptide from Mexican avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic for Jurkat cell line from acute lymphoid leukemia cells, through an apoptotic process. PaDef inhibited cell viability in a concentration-dependent manner, with an $IC_{50} = 47.3 \mu\text{M}$. Treatment of Jurkat cells with PaDef (IC_{50}) induced cell death by apoptosis dependent on caspases 8 and 9; besides, it was related to an increase in the production of reactive oxygen species and the loss of mitochondrial membrane potential. Interestingly, the inhibition of caspase activation by inhibitors of caspases 8 and 9 does not revert the reduction in viability, suggesting that other mechanisms, in addition to caspase activity, could be participating in the PaDef cytotoxic effect. Also, the modifications in the histone 3 tails induced by PaDef in Jurkat cells were evaluated, specifically acetylation and methylation. PaDef increased global histone 3 acetylation

Abbreviations: Act-D, Actinomycin D; ALL, Acute Lymphoblastic Leukemia; AMP, Antimicrobial Peptide; CI, Combination index; DMSO, Dimethyl sulfoxide; H3, Histone 3; H3K9Ac, Acetylation of lysine 9 on Histone 3; H3K9me2, Dimethylation of lysine 9 on Histone 3; H3K9me3, Trimethylation of lysine 9 on Histone 3; HDAC, Histone deacetylase; IARC, International Agency for Research on Cancer; IC_{50} , Inhibitory concentration 50; iHDAC, Histone deacetylase inhibitor; PaDef, *Persea americana* var. *Drymifolia*; PBS, Phosphate buffered saline; PMA, 4alpha-Phorbol 12-myristate 13-acetate; ROS, Reactive Oxygen Species; WHO, World Health Organization.

and lysine 9 specific marks (2-fold and up to 4-fold, respectively). These effects correlated with the reduction of the Histone Deacetylase activity (HDAC, ~50%). Based on methylation marks, PaDef treatment increased lysine 9 di- and trimethylation tags (2-fold in both cases). The epigenetic modulation induced by PaDef on Jurkat cells could be related to the chromatin compaction-decompaction promoting gene expression or repression; however, further studies are necessary to correlate these marks with the transcription of specific genes. Therefore, the study of new molecules that may have anticancer activity through epigenetic modulation is interesting.

Keywords: plant defensin, apoptosis, Leukemia, PaDef defensin, epigenetic modifications, Histone deacetylase inhibitor

INTRODUCTION

Cancer remains a serious threat worldwide. According to GLOBOCAN (2020), leukemias represent the 15th number of diagnosed cancer and the 11th place in cancer deaths worldwide. Data of the International Agency for Research on Cancer (IARC) of the World Health Organization (WHO) reports in 2018 around 430,000 new cases of leukemia worldwide and 300,000 deaths for this cancer (International Agency for Research on Cancer, 2020). Of the total of leukemia cases, 75% correspond to cases of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) (International Agency for Research on Cancer, 2020).

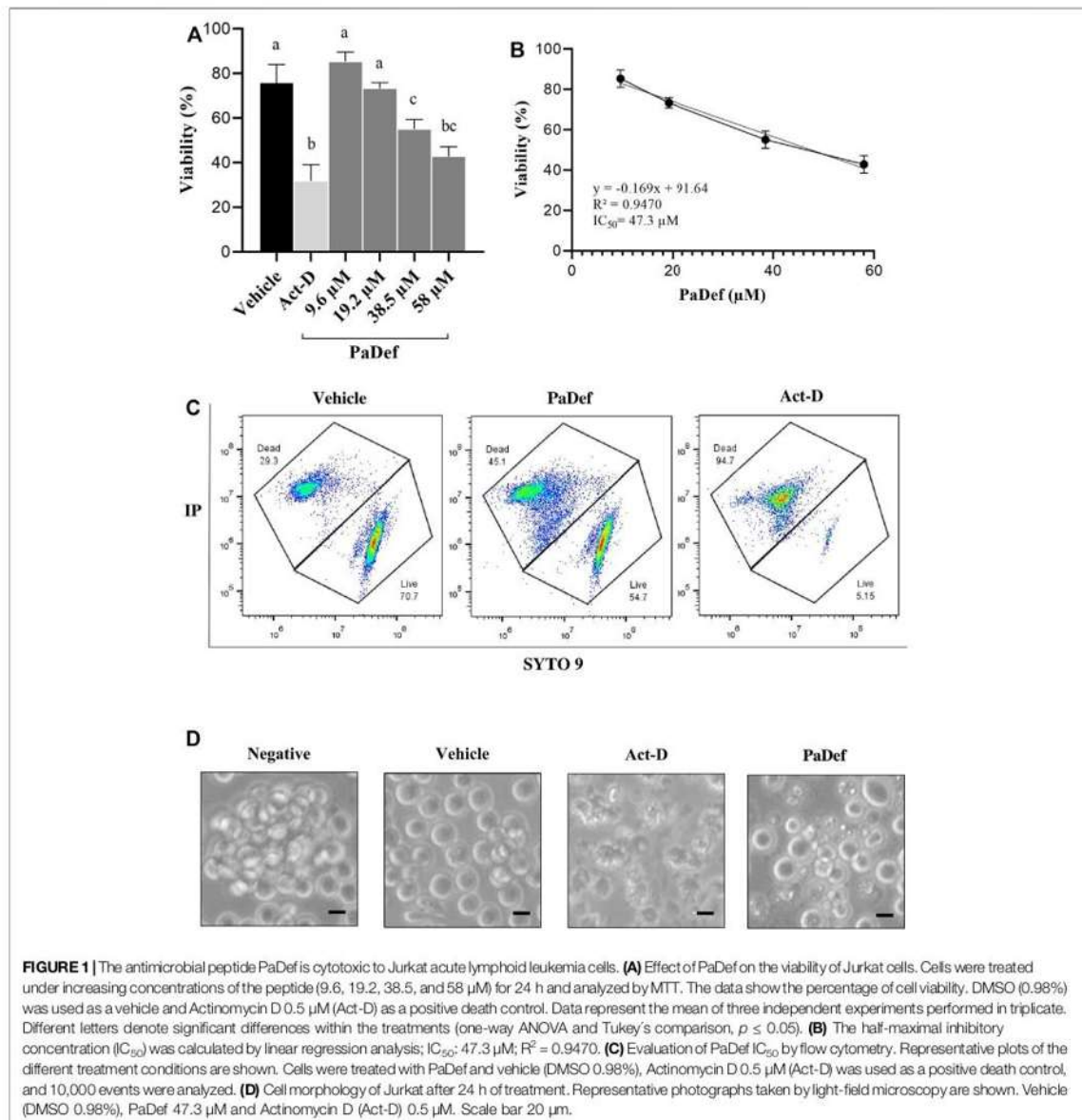
ALL arises from progressive malignant transformation and uncontrolled proliferation of lymphoid hematopoietic progenitor cells, which accumulate in the bone marrow, blood, and extramedullary sites (Terwilliger and Abdal Hay, 2017). The two main groups of this pathology are B-cell ALL and T-cell ALL, and 80% of the total cases occur in children (Terwilliger and Abdal Hay, 2017). The majority of cases (85–90%) correspond to B cell ALL, which generally has a good prognosis and a high cure rate (Bhojwani et al., 2015); however, when relapses are reported (10–15%) the disease usually culminates in early mortality (Wu and Li, 2018). The remaining percentage of total ALL cases (10–15%) corresponds to T-cell ALL that have a poor prognosis, with high relapse rates and low chances of recovery (Bhojwani et al., 2015). On the other hand, ALL in young and older adults has a worse prognosis with increasing age. The prognosis in older adults is poor because comorbidities prevent the administration of established chemotherapy regimens. Also, alterations that generate resistance to chemotherapeutic treatments can often occur (Aldoss et al., 2019). Furthermore, relapse in ALL is still a major cause of death related to this cancer for all ages (Roberts, 2018). In recent years, conventional chemotherapy has increased cure rates in ALL pediatric patients by up to 90% in developed countries (Paul et al., 2016). However, no substantial progress has been made to improve the cure rate in adults. Besides, the side effects of chemotherapy (myelosuppression, hepatotoxicity, cardiotoxicity) reduce the quality of life of patients and/or may put them at risk. Likewise, highlights the fact that

conventional chemotherapy is still insufficient to treat the entire population that presents the disease, and the search for new therapeutic strategies is essential (Wu and Li, 2018).

During the last few years, therapies with an epigenetic approach have emerged as a promise to improve responses to conventional chemotherapeutic treatments. It has been recognized that epigenetic alterations not only play a fundamental role in the initiation and development of cancer but also are fundamental for the appearance of chemoresistance. Unlike genetic mutations, epigenetic alterations are reversible, this fact makes them an attractive target for the search for epigenetic therapies against cancer (Gambacorta et al., 2019; Hajji et al., 2021).

Antimicrobial peptides (AMPs) are attractive molecules as an alternative for cancer treatment, due they are cytotoxic for tumor cells, show lower development of resistance, and have certain specificity towards cancer cells (Desjardins and Di, 2017). AMPs are produced by a great diversity of organisms (animals, plants, bacteria, fungi, protists, and archaea) as an essential component of their innate immune response (Sinha and Shukla, 2019). AMPs usually are short cationic molecules, ranging from 10 to 50 aa long and structurally form α -helices, β -sheets, extended structures, and loops (Desjardins and Di, 2017; Harey et al., 2017). The main function associated with AMPs is to protect against pathogens; however, immunomodulatory functions (Hazlett and Wu, 2011), mitogenic (Wong et al., 2006), antiangiogenic (Van Zeggel et al., 2012), and antitumor properties (Ren et al., 2012; Guzmán Rodríguez et al., 2016; Flores-Alvarez et al., 2018) have been described. To date, 3257 AMPs have been reported (<https://aps.unmc.edu/>), of which about 7.7% have a cytotoxic activity to cancer cells. Noteworthy, some AMPs are not toxic to normal mammalian cells and have a broad spectrum of cytotoxic activity on tumor cells. Also, it has been described the epigenetic modulation of AMPs related to anticancer activities, as is the case of lunasin, a peptide derived from soy that inhibits the acetylation of Histone 3 and 4 (Wan et al., 2017; Janssens et al., 2019). This fact increases the relevance of the study of AMP as an attractive source of new therapies against cancer.

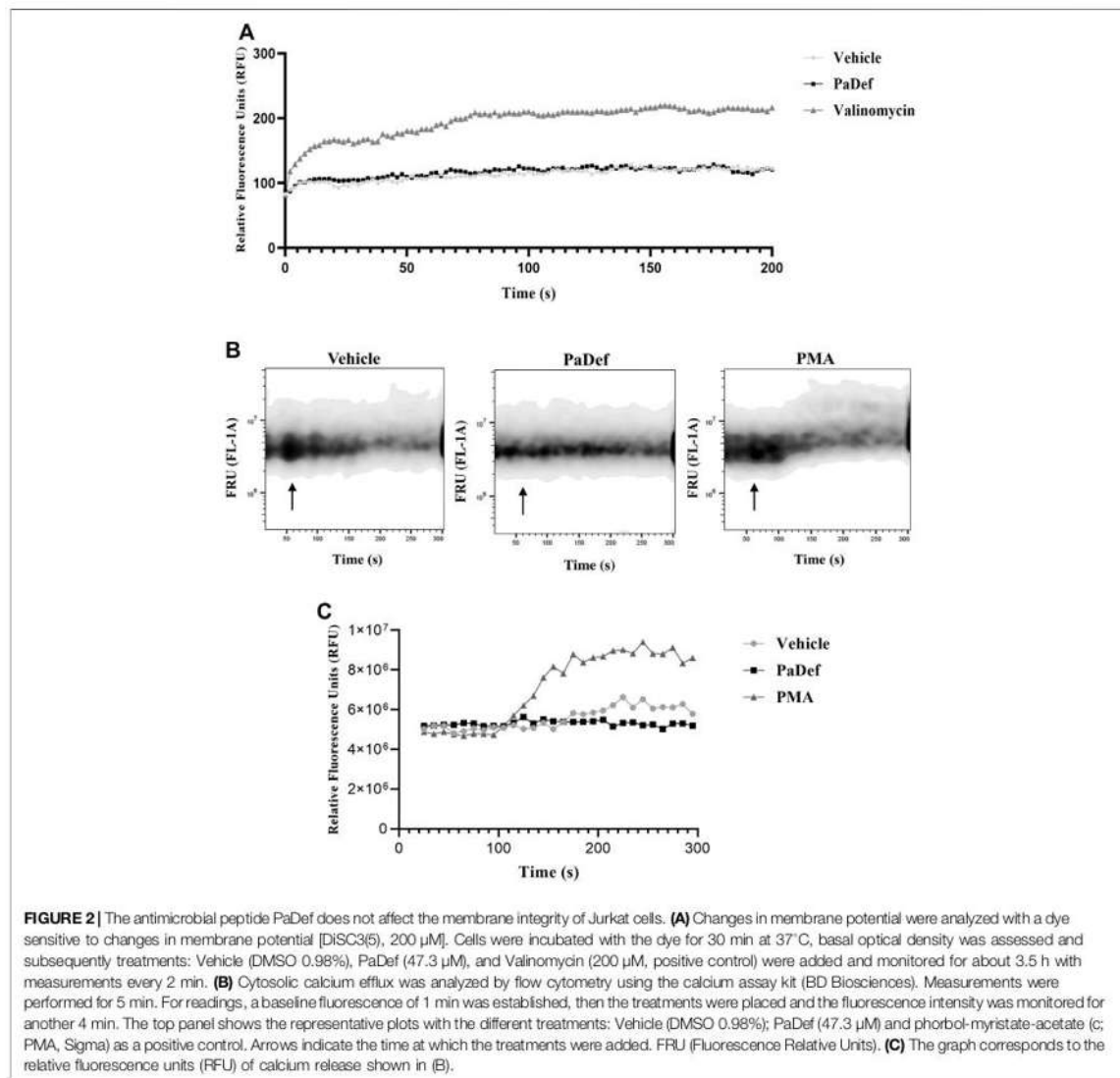
Plant defensins are cationic AMPs with 45–55 aa residues, notwithstanding their diversity in the aa sequence, these AMPs possess clear amino acid conservation in some of their positions,



such as 8 cysteine residues that allow them to form 4 disulfide bridges. Plant defensins are expressed in seeds, leaves, roots, barks, pods, tubers, fruits, and flower organs and their main functions involve antifungal and antibacterial activities; however, some defensins have a toxic effect on cancer cells without harming healthy cells (Guzmán-Rodríguez et al., 2015; Parisi et al., 2018). Previously, we have shown that defensin γ -Thionin from *Capsicum chinense*, a plant antimicrobial peptide with cytotoxic activity towards MCF-7 breast cancer cells, modulates global Histone 3 acetylation and

methylation marks, increasing the lysine 9 acetylation mark (H3K9Ac) and lysine 9 dimethylation mark (H3K9me2) (Arceo-Martínez et al., 2018). However, the role of epigenetic modulation of AMPs in their cytotoxic activity is still an understudied field.

In previous work, we demonstrated that the PaDef defensin from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to MCF-7 breast cancer cells, through the induction of apoptosis intrinsic pathway (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). On the other hand, the cytotoxic effect of the



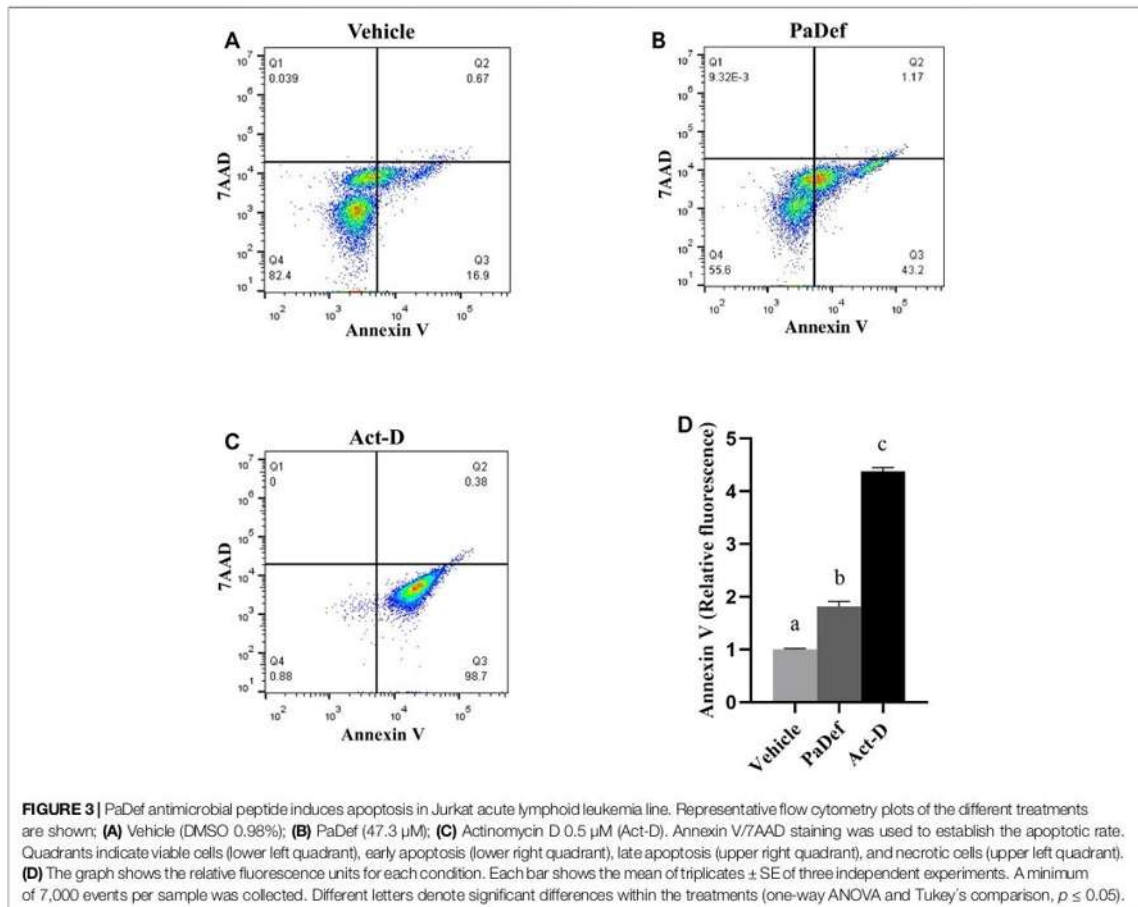
peptide was tested in the hematological cell line K562 from chronic myeloid leukemia, inducing apoptosis through the extrinsic pathway (Flores-Alvarez et al., 2018). Additionally, the peptide has been tested in peripheral blood mononuclear cells without showing a cytotoxic effect (Guzmán-Rodríguez et al., 2016; Flores-Alvarez et al., 2018).

In the present work, we show that PaDef is cytotoxic to the acute lymphoid leukemia cell line Jurkat, activating the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. Furthermore, we assessed whether the PaDef cytotoxicity was related to epigenetic modifications in the histone 3 (H3), specifically the global and lysine 9 (K9) acetylation marks, as well as changes in the di- and trimethylation (me2 and me3) marks of H3 lysine 9.

MATERIALS AND METHODS

Peptide

The peptide used in this work corresponds to the mature region of PaDef (ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCHGEHFTDGRCCQGVRRRCMLKPC, 47 aa) (Genbank KC007441) (Guzmán-Rodríguez et al., 2013). This peptide was chemically synthesized and obtained from BIOMATIK. The peptide at a concentration of 962 μ M was resuspended in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO), and then air oxidized for 5 days at room temperature for disulfide bond formation. For all of the experiments, the final concentration of vehicle (DMSO) was 0.98%, which was also used as a control. The peptide was used



in a concentration range of 9.6–58 μ M in agreement with the results observed from a previous study in the leukemia cell line K562 (Flores-Alvarez et al., 2018). Primary and secondary structures of the peptide are shown in **Supplementary Figure S1**.

Jurkat Cell Culture

The Human Jurkat cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 12.5% fetal bovine serum (v/v) (FBS, Corning) and 100 U/mL penicillin and streptomycin (Gibco), in an atmosphere of 5% CO₂ and at 37°C.

MTT Viability Assay and Determination of the Half-Maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀)

Jurkat cells (2×10^4 cells/well) were cultured in 96-well plates and synchronized in RPMI-1640 medium by serum deprivation for approximately 18 h. Cells were then treated with PaDef peptide 9.6–58 μ M and DMSO (0.98%, control) and incubated for 24 h as

reported (Flores-Alvarez et al., 2018). After incubation with the treatments, 10 μ L of MTT solution (5 mg/mL, Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 10 mM KH₂PO₄) was added to each well and incubated for 4 h at 37°C. Finally, formazan crystals were dissolved with acidic isopropanol (100 μ L, 95% isopropanol, and 5% 1N HCl). Absorbance measurements were performed in a microplate reader (Bio Rad) at 595 nm. Actinomycin D (0.5 μ M, Act-D) (Cayman Chemical) was used as a positive control for cell death. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by linear regression analysis using the program GraphPad Prism 8. To corroborate the IC₅₀ calculated, a flow cytometric assay was performed using SYTO 9 fluorescent green and propidium iodide for nucleic acid staining (Invitrogen). For the assay, 8×10^4 cells/well were cultured in 24-well plates and synchronized with serum-free RPMI-1640 medium for 18 h and then treated for 24 h with the IC₅₀ calculated and with vehicle (DMSO 0.98%). Finally, cells were stained with the fluorochromes according to the manufacturer's instructions and analyzed in a BD Accuri™ C6 cytometer (BD

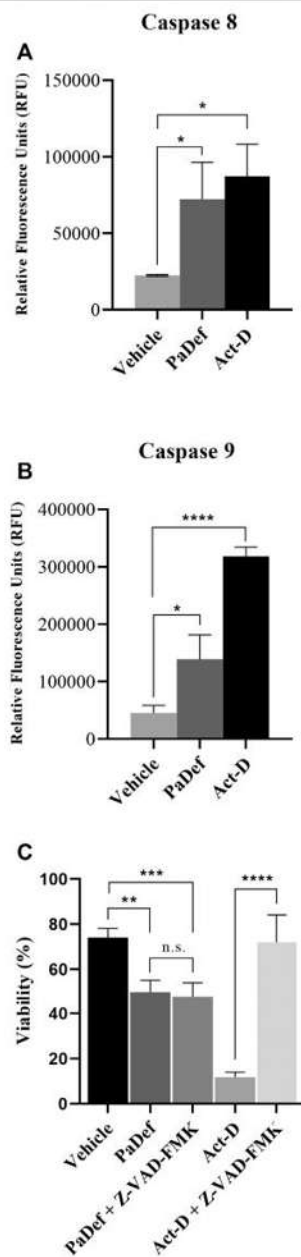


FIGURE 4 | Antimicrobial PaDef peptide induces activation of caspases 8 and 9 in Jurkat cells. Cells were treated for 24 h with vehicle (DMSO 0.98%), PaDef (47.3 μ M) and Actinomycin D (0.5 μ M, Act-D). Cells were stained using FITC-IETD-FMK for caspase 8 (A) and FITC-LEHD-FMK for caspase 9 (B) and subsequently analyzed by flow cytometry. (C) Viability assay (MTT). Cells were treated for 24 h with vehicle (DMSO 0.98%), PaDef (47.3 μ M), or Actinomycin D (0.5 μ M) with or without Pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Continued)

FIGURE 4 | (added 1 h before the above treatments). Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of three independent experiments. * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$) and **** ($p \leq 0.0001$) indicate the significant statistical difference compared between treatments (One-way ANOVA and Tukey's pairwise comparison, $p \leq 0.05$).

Biosciences). For the rest of the experiments, the IC_{50} corroborated in this assay was used.

Measurement of the Transmembrane Potential

Depolarization of the cellular transmembrane potential was assessed using the membrane potential sensitive dye 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide, DiSC3 (5) (Sigma). For this, 2×10^4 cells/well were cultured in 96-well black-bottom plates. Before the culture, cells were washed twice with Hanks HEPES buffer and resuspended with 100 μ L of Hanks HEPES buffer containing DiSC3 (5) (200 μ M), seeded into the wells of the plate, and incubated for 30 min in a CO_2 incubator. PaDef 47.3 μ M and DMSO were added to the assays in sextuplicate, and subsequent changes in fluorescence intensity were monitored for 2 h on a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific). Valinomycin was used as a positive control (Sigma, 200 μ M).

Calcium Efflux Testing

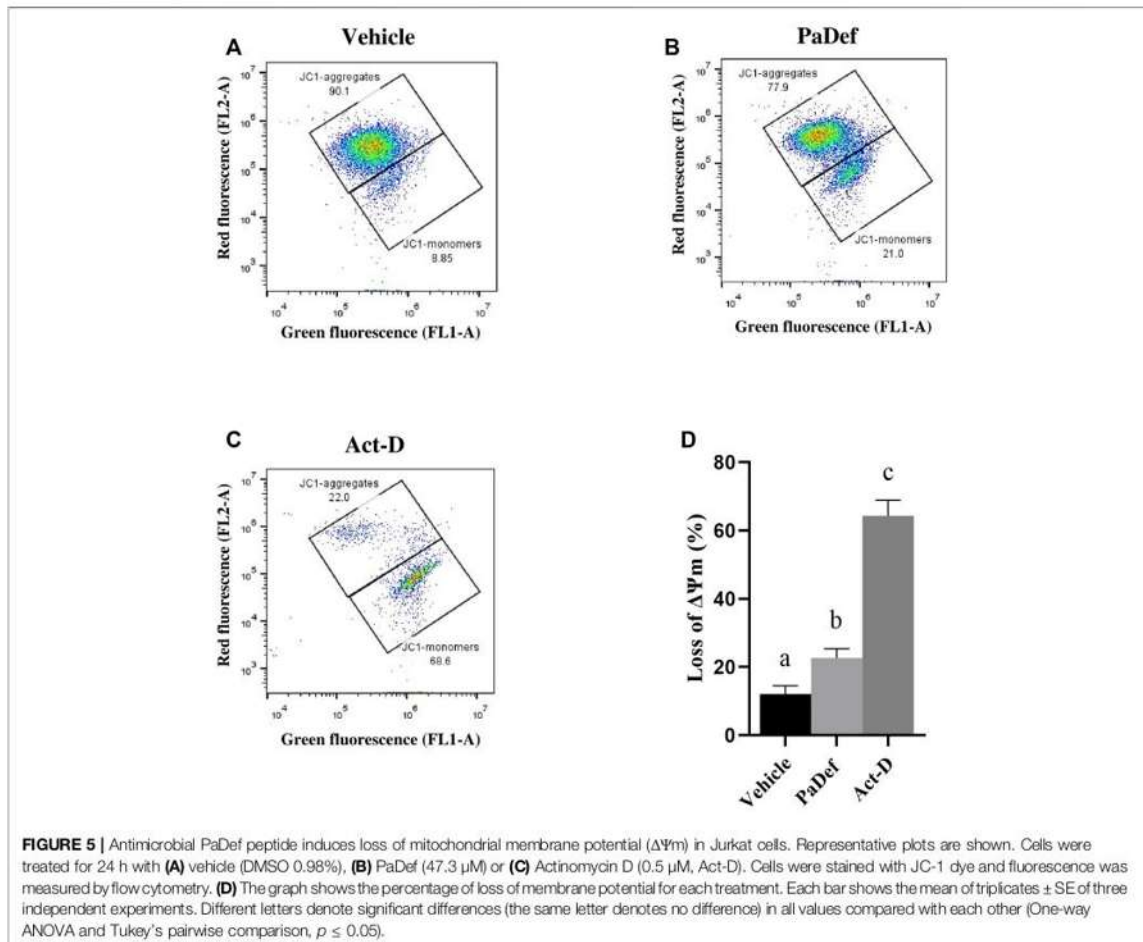
Calcium flux was assessed in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) using the calcium assay kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. For the assay, 1×10^5 cells were used for each treatment. Cells were synchronized for 18 h in RPMI-1640 medium without serum and then incubated with the indicator dye for 1 h. The flow cytometry readings were set with a baseline fluorescence of 1 min, then PaDef 47.3 μ M and control (DMSO 0.98%) treatments were added, the fluorescence intensity was monitored for another 4 min. 4 α -Phorbol 12-myristate 13-acetate (3 mM; PMA, Sigma) was used as a positive control.

Caspase Activity Assay

Assays were performed with 8×10^4 cells/well in 24-well plates. Cells were synchronized for 18 h in RPMI-1640 medium without serum and then were treated for 24 h with PaDef 47.3 μ M or vehicle (DMSO 0.98%). After this, cells were collected and stained according to the manufacturer's instructions (kit CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-8 or Caspase-9 Staining Kit). Caspase activity was measured through specific pharmacological inhibitors LEHD-FMK (inhibitor of caspase 9) and IETD-FMK (inhibitor of caspase 8) conjugated with fluorescein (FITC) that bind to the active enzyme. Actinomycin D (0.5 μ M) was used as a positive control for cell death. The data were analyzed in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using the Accuri™ C6 software.

Assessment of Apoptosis

Assays were performed with 8×10^4 cells/well in 24-well plates. Cells were synchronized and treated as described for caspase activity assays. After 24 h of treatment, cells were collected and



stained according to the manufacturer's instructions (annexin V, Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen). The rate of apoptosis was determined using annexin V and 7AAD in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo v10.4 software (TreeStar, Inc.). Actinomycin D (0.5 μ M) was used as a positive control for apoptosis.

Assessment of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$)

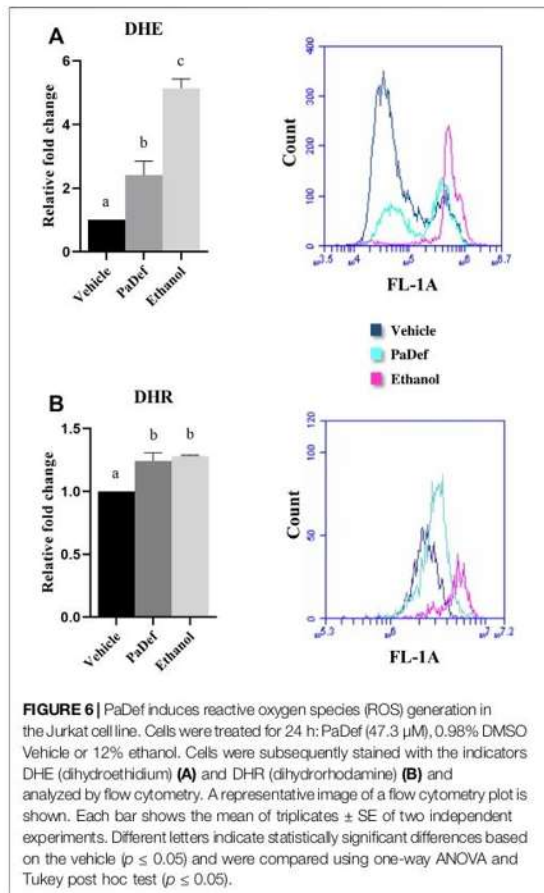
Assays were performed with 8×10^4 cells/well in 24-well plates and cells were synchronized and treated as described above. Cells were collected and stained with JC-1 dye (BD Biosciences) for 15 min at 37°C in the dark according to the manufacturer's instructions. The cells were washed twice with assay buffer, and the fluorescence was measured in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) using FlowJo software (TreeStar, Inc.). The JC-1 dye allows the differentiation of healthy cells (red fluorescence) from those with mitochondrial damage (green fluorescence).

Determination of Reactive Oxygen Species

This assay was performed by flow cytometry in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) using DHE (dihydroethidium 5 μ M, Molecular Probes) or DHR (dihydrorhodamine-123, 15 μ M, Molecular Probes). Assays were performed with 8×10^4 cells/well in 24-well plates. Cells were synchronized for 18 h in RPMI-1640 medium without serum and then treated with PaDef 47.3 μ M or vehicle (DMSO 0.98%) for 24 h. Cells were collected and washed with PBS. Cells were resuspended in PBS with DHR or DHE and incubated for 1 h and 30 min, respectively, at 37°C in the dark. Ethanol 12% was used as a positive control. A total of 10,000 events were analyzed.

Histone Extraction and Western Blot Analysis

Jurkat cells (1×10^6 cells) were synchronized for 18 h by serum deprivation, then treated with PaDef 47.3 μ M and vehicle (DMSO 0.98%) for 24 h. Then, they were washed 2 times with cold PBS



and proceeded to histone extraction by acid extraction (Salgado-Lora et al., 2020). For this, the cells were resuspended in 1.5 mL of H-lysis solution (0.25 M sucrose, 3 mM CaCl_2 , 1 mM Tris pH 8, and 0.5% NP-40) and shook. Subsequently, the cell pellet was washed with 1 mL of H-wash solution (300 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT and 0.5% NP-40). Histone extraction was performed with the addition of 200 μ L of H-extraction solution (0.5 M HCl, 10% glycerol, and 0.1 M 2-mercaptoethylamine-HCl), incubated on ice for 30 min. Further, cells were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, the supernatant was recovered and cold acetone was added 1:5 ratio. Histones were allowed to precipitate for 5 days under refrigeration and the precipitate was recovered by centrifugation (13,000 rpm for 10 min) and dissolved in 20 μ L of sterile deionized water and stored at -80°C until use.

For western blot analysis, histone samples were separated by electrophoresis on a 15% SDS-PAGE gel, and then transferred to a PVDF membrane using a semi-dry transfer unit (Fisher Scientific). For this, the gel was equilibrated for 15 min in transfer solution III (0.3 M Tris pH 10.4) and the membrane

(previously hydrated in methanol) in solution II (0.25 M Tris pH 10.4). The transfer sandwich was assembled and allowed to run at 15 V for 1 h. The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk powder dissolved in cold PBS and left at 4°C overnight. The membranes were washed three times with cold TBS, and then the primary antibody (1:1,000) was added and incubated at 4°C overnight. The following antibodies against specific histone modifications were used: global acetylation (H3K9, K14, K18, K23, K27) (Abcam ab47915), H3K9ac (Abcam, ab10812) for acetylation, H3K9me2 (Abcam Ab1220), and H3K9me3 (Abcam, ab8898) for di- and tri-methylation, respectively, and antibody for histone H3 (Abcam, ab1791) was used for loading control. Subsequently, the membranes were incubated for 2 h at 4°C with horseradish peroxidase-coupled anti-IgG secondary antibody (1:3,000) (Cell Signaling Technology). The membranes were washed three times and 100 μ L of WesternSure ECL substrate was added. Finally, the membranes were placed between two plastic sheets and exposed to an X-ray plate. The plate was manually developed in the dark. The intensity of the signals was quantified by densitometry with ImageJ software. 3.5 mM sodium butyrate was used as a positive control for H3K9 acetylation induction and negative for H3K9me2/3 methylation induction. Data were normalized based on H3 and presented as the relative level of expression for the vehicle.

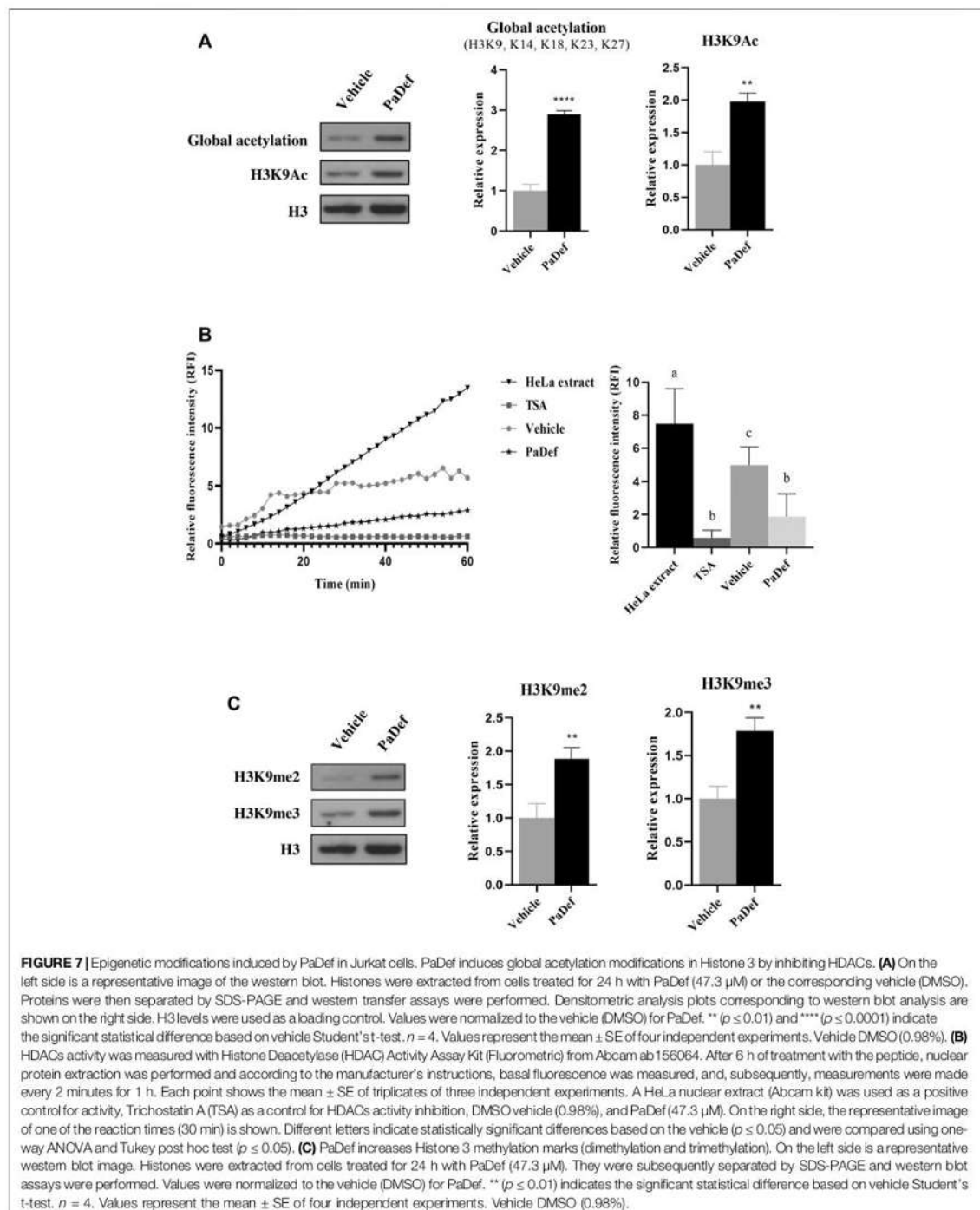
HDACs Activity Assay

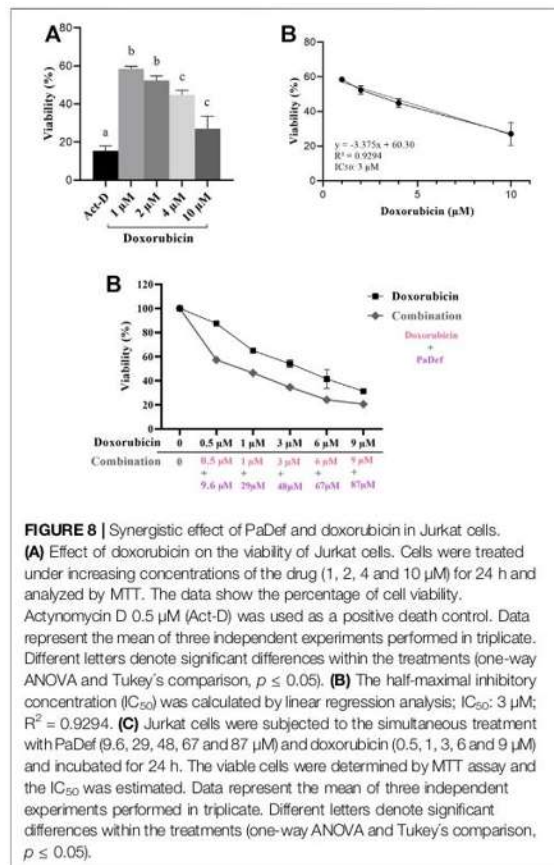
Jurkat cells (1×10^6 cells) were synchronized for 18 h by serum deprivation, then treated with PaDef 47.3 μ M and vehicle (DMSO 0.98%) for 6 h. Then, they were washed 2 times with cold PBS, and preparation of samples for the fluorometric assay was performed according to the manufacturer's instructions [Histone Deacetylase (HDAC) Activity Assay Kit Fluorometric Kit ab156064, Abcam]. The changes in fluorescence intensity were monitored for 1 h in a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific).

Cytotoxicity of Doxorubicin and the Combination With PaDef

The cytotoxicity of doxorubicin or its combination with PaDef was assessed by MTT assays. Jurkat cells (2×10^4 cells/well) were cultured in 96-well plates and synchronized in RPMI-1640 medium by serum deprivation for approximately 18 h. Cells were then treated with doxorubicin 1–10 μ M and incubated for 24 h. For the drug combination, the same aforementioned concentrations of doxorubicin and PaDef (9.6–87 μ M) were used, and incubated for 24 h. Doxorubicin and PaDef were added simultaneously for the combination study. They were subsequently treated and analyzed as described in the MTT viability assay section.

Combination index (CI) was used to evaluate the combination effect based on IC_{50} values obtained from individual doxorubicin or PaDef, and the combined treatment (Chou and Talalay, 1984). CI was calculated according to the following equation, $\text{CI} = (\text{D})\text{com}_1 / (\text{D})_1 + (\text{D})\text{com}_2 / (\text{D})_2$ in which $(\text{D})\text{com}_1$ (or $(\text{D})\text{com}_2$) is the IC_{50} value for treatments 1 (or 2) in the combination, $(\text{D})_1$ (or $(\text{D})_2$) is the IC_{50} value from individual treatment. The resulting





combination index (CI) was then used to determine the outcome of the drug combination effect as (I) additive effect ($\text{CI} = 1$), (II) synergism ($\text{CI} < 1$), or (III) antagonism ($\text{CI} > 1$).

Statistical Analysis

The data were analyzed with PRISM 8.0.2 software by performing a one-way analysis of variance (one-way ANOVA) and using the post hoc Tukey test. The results are reported as the mean \pm the standard errors (SE), and the significance level was set at $p \leq 0.05$. On the other hand, for western blot analysis, the Student's *t*-test was used with a significance level of $p \leq 0.05$.

RESULTS

The Antimicrobial Peptide PaDef is Cytotoxic to Jurkat Acute Lymphoid Leukemia Cells

The effect of PaDef on the viability of the Jurkat cell line was analyzed by MTT assay. Increasing concentrations of the peptide (9.6, 19.2, 38.5 and 58 μM) were used for 24 h. **Figure 1A** shows

that the cytotoxic effect of the peptide on the Jurkat cell line was in a concentration-dependent manner. From these results, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) calculated was 47.3 μM (**Figure 1B**) and corroborated by flow cytometry (**Figure 1C**). For the rest of the experiments, this concentration was used. Also, cell morphology was analyzed by microscopy, evident alterations were observed in cells treated with PaDef and Actinomycin D (**Figure 1D**).

The Antimicrobial Peptide PaDef Does Not Affect Membrane Integrity in Jurkat Cells

One of the main described mechanisms of cytotoxic action of AMPs is the destabilization and disruption of the plasma membrane of cells. Therefore, the effect of PaDef on Jurkat cells membrane was evaluated. For this, membrane electrical potential and intracellular calcium efflux were assessed. The results indicated that PaDef treatment does not affect either the cell membrane potential (**Figure 2A**) or the calcium flux assay (**Figures 2B,C**). According to these results, the cytotoxic effect of PaDef on Jurkat cells does not involve damage to the plasma membrane.

The Cytotoxic Effect of the Defensin PaDef on Jurkat Cells is Associated With Apoptosis Induction Through the Intrinsic and Extrinsic Pathways

Plant AMPs have been described to induce death in cancer cells mainly through activation of apoptosis, but necrosis has also been reported (Guzmán-Rodríguez et al., 2015; Baxter et al., 2017). For this reason, we consider evaluating whether PaDef activates apoptosis in the Jurkat cell line. In **Figure 3**, representative plots of the flow cytometry assay with the treatments for 24 h are shown, in which it can be observed that PaDef induces apoptosis (upper and lower right quadrants of the plots) in the Jurkat cell line with a similar effect to Actinomycin D. In this same assay, necrosis (upper left quadrant of the plot) was evaluated using the 7AAD dye, the results indicated that PaDef does not induce this process in the cells.

Further, to determine the apoptosis pathway activated, the activity of caspases was assessed by flow cytometry. Jurkat cells treated with PaDef for 24 h showed activation of both caspase 8 and caspase 9 (**Figures 4A,B**). These results indicate that the peptide triggers apoptosis through both apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic). Subsequently, by MTT it was determined if the inhibition of the activity of caspases blocks the death induced by PaDef. Jurkat cells treated 1 h with the Pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK and then treated with PaDef (**Figure 4C**) showed a reduction in viability, which suggests that caspases are not the only mode of activation of apoptosis fired on these cells. Additionally, the activation of the intrinsic pathway of apoptosis was assessed by flow cytometry using the dye JC1, which is sensitive to changes in mitochondrial membrane potential. Cells treated with PaDef for 24 h showed a loss in mitochondrial membrane potential, suggesting that the intrinsic pathway of apoptosis is being activated (**Figure 5**). Also,

it was evaluated if PaDef induces ROS production. The results indicated that PaDef induced the production of ROS, specifically the production of hydrogen peroxide (H_2O_2) (Figure 6A) and superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) (Figure 6B).

The Antimicrobial Peptide PaDef induces Global Acetylation Modifications in Histone 3 by inhibiting HDACs

It has been shown that plant AMPs can play a role as epigenetic modulators in cancer cells (Arceo-Martínez et al., 2018; Janssens et al., 2019). To evaluate whether the cytotoxic effect of PaDef was related to epigenetic modifications, we explored some epigenetic marks of Histone 3 (H3). For these assays, Jurkat cells were treated with PaDef for 24 h and then histone protein extraction was performed and the corresponding western blotting was carried out. The results showed that PaDef up modulates (~3 fold) the H3 global acetylation marks (H3K9, K14, K18, K23, K27) and histone 3 lysine 9 acetylation mark (H3K9me3) (Figure 7A). For these assays, sodium butyrate (NaB 3.5 mM) was used as a positive control for acetylation (Supplementary Figure S2A).

According to these results, we evaluate if PaDef affects the activity of HDACs. For this purpose, Jurkat cells were treated for 6 h with PaDef (optimal time of activity reported by Arceo-Martínez et al., 2018). The results showed that AMP significantly inhibits ~50% HDACs activity (Figure 7B).

The Antimicrobial Peptide PaDef increases Histone 3 Methylation Marks (Dimethylation and Trimethylation)

Further, methylation marks (H3K9me2 and H3K9me3) on H3 were measured. The results showed that PaDef up-modulates the expression of dimethylation (H3K9me2, ~1.7 fold) and trimethylation (H3K9me3, ~1.7 fold) marks of lysine 9 on H3 (Figure 7C). For these assays, NaB (3.5 mM) was used as a negative control for methylation (Supplementary Figure S2B).

Additionally, other epigenetic marks such as the H3 lysine 4 methylation (H3K4me3) and the H3 serine 10 phosphorylation (H3S10P) were analyzed; however, none of them were modified (data not shown).

Cytotoxicity of Doxorubicin and the Combination With PaDef

Finally, we evaluated the combined cytotoxic effect of PaDef with a conventional A.L.L. chemotherapeutic, doxorubicin. The effect of doxorubicin on the viability of the Jurkat cell line was analyzed by MTT assay. Increasing concentrations of the doxorubicin (1, 2, 4 and 10 μ M) were used for 24 h. From these results, the IC_{50} calculated was 3 μ M (Figure 8A).

For the combined effect of PaDef and doxorubicin, concentrations were chosen considering the IC_{50} obtained from each of them. The combined treatment showed a decrease in viability ranging 40–80% (Figure 8B). Synergy analysis for the combination of treatments showed a CI

(combinatorial index) of less than 1 (0.76) indicating a synergistic effect.

DISCUSSION

Pediatric oncology has made substantial advances in the cure of ALL. However, conventional chemotherapeutic treatments still are highly toxic and show low selectivity, also are insufficient for high-risk patients (young adults and older adults) and patients with poor prognoses (with additional mutations or epigenetic alterations); therefore, it is necessary the development of new therapies directed towards the search for molecules with specific antileukemic activity with low toxicity and high selectivity. In addition (based on the genotypic, immunophenotypic, and epigenetic characterization of the patients), these new therapies will improve the remission and survival rates of patients with leukemia. In this regard, AMPs have emerged as an interesting target for their study as therapeutic candidates against cancer, including leukemias. This interest arises from desirable characteristics of AMPs such as higher specific cytotoxicity against tumor cells and not to healthy cells, fewer adverse effects compared to conventional therapeutics, a lower tendency to develop resistance, and also, they can exhibit a broad spectrum of cytotoxic activity on tumor cells (Guzmán-Rodríguez et al., 2015; Deslouches and Di, 2017). In this work, we showed that the plant defensin PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to the Jurkat cell line and modifies epigenetic marks, which leads to considering it as an interesting candidate in the searching of molecules against leukemias.

The AMP PaDef showed cytotoxicity on the Jurkat cells, a cell line from acute lymphoid leukemia, whose effect was concentration-dependent with an IC_{50} of 47.3 μ M. In previous studies, we demonstrated that PaDef also was cytotoxic on the K562 (18.7 μ M) leukemia cell line from the myeloid origin (Flores-Alvarez et al., 2018) and for the cell line MCF-7 (27.2 μ M) from breast cancer (Guzmán-Rodríguez et al., 2016), being the Jurkat cell line the most resistant, and apoptosis induction the cytotoxic mechanism of the peptide on the three cell lines. Interestingly, the cytotoxic effect of PaDef on the cancer cell lines appears to be selective, since the peptide did not show a cytotoxic effect on peripheral blood mononuclear cells (Guzmán-Rodríguez et al., 2016; Flores-Alvarez et al., 2018).

Several mechanisms have been described by which AMPs from different origins can cause cancer cell death, including necrosis, autophagy, antiproliferative effects, and apoptosis (Baxter et al., 2017). In this work, we demonstrate that PaDef induces apoptosis in Jurkat cells. PaDef induced an increase in the activity of caspases 8 and 9, which activate the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis, respectively. Additionally, PaDef treatment induced a loss of mitochondrial membrane potential in Jurkat cells and an increase in the generation of ROS, which is characteristic of the apoptosis intrinsic pathway. Moreover, the induction of apoptosis was not dependent on changes in the cell cycle (data not shown). Dysregulation of components of the apoptotic pathway may confer a proliferative and survival advantage to cancer cells and also play an important role in

the resistance to chemotherapeutic drugs and cancer recurrence (Ferna'nd and Kurokawa, 2013; Mohammad et al., 2015). Because of this, the study of molecules capable of restoring the apoptosis process is promising in the search for new cancer therapies.

On the other hand, the study of molecules with epigenetic activity on cancer cells has gained importance, based on the fact that epigenetic alterations are involved in the development and progression of cancer. Unlike genetic mutations, epigenetic alterations are reversible, which makes them an attractive target for study (Gambacorta et al., 2019; Hajji et al., 2021). There are several leukemia treatments with an epigenetic activity that are in clinical trials (phase I to III), as well as some that have already been approved by the U.S. Food and Drug Administration for different cancer treatments. However, none of these employ antimicrobial peptides. Some of the therapies target direct DNA methylation (e.g., azacitidine and decitabine) and some others target histone modifiers, such as histone methyltransferase inhibitors (e.g., Tazemenostat and Pinomenostat), histone demethylase inhibitors (e.g., Tranylcypromine and GSK2879552), and histone deacetylase inhibitors (iHDACs, e.g., Belinostat and Vorinostat) (Kelly and Issa, 2017). iHDACs promote a decompacted state of chromatin, allowing active gene transcription to be maintained, as well as the acetylation of non-histone proteins. Several mechanisms have been proposed by which iHDACs promote their anticancer action, including cell cycle arrest, ROS production, induction of apoptosis, inhibition of DNA repair, antiangiogenic effects, or may allow acetylation of non-histone proteins (Laksunataiah et al., 2014; Li and Seto, 2016). Of these, apoptosis induction can be activated through both apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic). Additionally, it is known that iHDACs can activate apoptosis through the production of ROS, which has been demonstrated in several leukemia cell lines (Jurkat, ML-1, U937, HL-60, K-562) (Eckschlager et al., 2017). In concordance, we demonstrated that PaDef inhibits HDACs activity in the Jurkat cell line, whereas increases H3K9Ac. Moreover, as mentioned above, PaDef induces ROS production and triggers apoptosis through both intrinsic and extrinsic pathways. Therefore, we propose that cytotoxic PaDef activity may involve its act as an iHDAC.

Interestingly, the apoptotic activity of PaDef was not blocked by the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Figure 4), i.e., the cytotoxic activity of PaDef was maintained, regardless of caspase blockade. This behavior was already described for an iHDAC, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) in the T-cell ALL cell line (CEM-CCRF) and in hepatocarcinoma cells (HepG2). SAHA induces mitochondrial membrane damage, with subsequent cytochrome c release, through ROS production and does not require activation of caspases 8 and 3. In this case, mitochondrial membrane damage was achieved by cleavage (activation) of the proapoptotic member of the Bcl-2 family named Bid (Ruefli et al., 2001; Emanuele et al., 2007). Therefore, it is necessary to analyze the pro-apoptotic members of the Bcl-2 family that may be involved in caspase-independent activation of apoptosis by PaDef in Jurkat cells.

Regarding the increase in methylation marks (H3K9me2 and H3K9me3) in the Jurkat cell line induced by PaDef treatment,

there is no direct correlation between elevated H3 acetylation marks and an increase in H3 lysine 9 methylation marks. However, several studies indicate that iHDAC treatments have an impact on histone methylation status and may also induce changes in the expression of histone modulators so that the effects at the chromatin level and structure are not yet fully delineated (Huil et al., 2016). Regarding the effects of iHDAC on H3, changes have been found in marks such as H3K27me3, H3K4me3, or H3K9me3 (Huang et al., 2011; Sanders et al., 2011; Valdez et al., 2015; Ciesielski et al., 2020). For example, the treatment with the depsipeptide romidepsin, which is an iHDAC, in PEER and SUPT1 cells (T-cell ALL and T-cell lymphoblastic lymphoma, respectively) increases the acetylation status of H3 and in turn, increases the trimethylation mark of lysine 27 on H3 (H3K27me3), and this compound also induces apoptosis and favors ROS production, which is associated with mitochondrial membrane damage (Valdez et al., 2015). The effect of romidepsin agrees with the effect of PaDef here reported.

So far, epigenetic therapy including iHDACs, administered as monotherapy, has shown promising preclinical results; however, clinical trials have had limited success due to moderate response, lack of specificity, and toxic effects in patients. However, the combination of iHDACs with conventional chemotherapeutic agents has shown synergistic effects and decreased resistance to conventional treatments. The use of this type of treatment has been increasing in recent years based on the search for specific and non-cytotoxic iHDACs (Sun et al., 2019; Hontecillas-Prieto et al., 2020). In this regard, as a first approach to the use of PaDef as an iHDACs we tested the combined effect of PaDef with one of the conventional chemotherapeutics for leukemias: Doxorubicin. The resulting synergistic effect between the two treatments indicates that PaDef could be a promising peptide in combined therapy against leukemias, based on its epigenetic effect on the Jurkat cell line as an iHDAC.

A complete understanding of molecules with iHDAC activity is still far off and requires to be studied at multiple levels because their effects are reflected not only at the chromatin level (histone acetylation and histone methylation changes), but may also involve acetylation changes in non-histone proteins, which in turn can regulate cell signaling pathways, culminating not only in changes in gene expression. The probable interaction of PaDef with intracellular target is very interesting; however, it has been reported that the AMPs cecropin A, magainin 2, and indolicidin can be degraded by 100% after 24 h using cytosolic extracts of human erythrocytes (Starr and Wimley, 2017). Until now, we do not know if PaDef could be also degraded by intracellular proteases.

CONCLUSION

Results from this work strongly suggest that PaDef can be an attractive cytotoxic plant antimicrobial peptide against ALL, whose antiproliferative activity could be related to epigenetic modulation, which can lead to the chromatin compaction-decompaction promoting gene expression or repression.

However, further studies are necessary to correlate epigenetic marks with the transcription of specific genes. These novel effects have not been described until now for plant defensins.

the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

FUNDING

This work was supported by the grants from CONACyT (CB 2016-287210) and CIC 14.1 from Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo to AOZ. PJ-A obtained a PhD Scholarship from CONACyT (715504).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PJ-A, RL-G, JL-M, and AO-Z conceptualized and designed the experiments. PJ-A performed the experiments. PJ-A, RL-G, JL-M, and AO-Z analyzed the data. PJ-A, RL-G, JL-M, and AO-Z wrote

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.801816/full#supplementary-material>

REFERENCES

Aldoss, I., Forman, S. J., and Pullarkat, V. (2019). Acute Lymphoblastic Leukemia in the Older Adult. *Top* 15, 67–75. doi:10.1200/JOP.18.00271

Arceo-Martínez, M. T., Guzmán-Rodríguez, J., Palomera-Sánchez, Z., Ochoa-Zarzosa, A., and López-Meza, J. E. "Defensin γ -Thionin from *Capsicum Chinense* Induces Apoptosis in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 and Regulate Histone H3 Epigenetic Modifications," in Proceedings of the ASBMB Conference presentation Convention Experimental Biology (EB), San Diego, CA, United States, April 2018.

Barter, A. A., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Kvasnakul, M., and Hulett, M. D. (2017). Tumor Cell Membrane-Targeting Cationic Antimicrobial Peptides: Novel Insights into Mechanisms of Action and Therapeutic Prospects. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 3809–3825. doi:10.1007/s00018-017-2604-z

Bhojwani, D., Yang, J. J., and Pui, C. H. (2015). Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Clin. North Am.* 62, 47–60. doi:10.1016/j.pcl.2014.09.004

Chou, T. C., and Talalay, P. (1984). Quantitative Analysis of Dose-Effect Relationships: the Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27–55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4

Ciesielski, O., Biesiekierska, M., and Balcerzyk, A. (2020). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Alters Histone Acetylation and Methylation and Impacts Chromatin Architecture Profile in Human Endothelial Cells. *Molecules* 25, 2326. doi:10.3390/molecules25102326

Dealouches, B., and Di, Y. P. (2017). Antimicrobial Peptides with Selective Antitumor Mechanisms: prospect for Anticancer Applications. *Oncotarget* 8, 46635–46651. doi:10.18632/oncotarget.16743

Eckschlager, T., Pith, J., Šteborova, M., and Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Ijms* 18, 1414. doi:10.3390/ijms18071414

Emanuele, S., Lauricella, M., Carlisi, D., Vassallo, B., D'Anneo, A., Di Fazio, P., et al. (2007). SAHA Induces Apoptosis in Hepatoma Cells and Synergistically Interacts with the Proteasome Inhibitor Bortezomib. *Apoptosis* 12, 1327–1338. doi:10.1007/s10495-007-0063-y

Fernald, K., and Kurokawa, M. (2013). Evading Apoptosis in Cancer. *Trends Cell Biol* 23, 620–633. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.006

Flores-Alvarez, I. J., Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garcigla, R., Ochoa-Zarzosa, A., and López-Meza, J. E. (2018). PaDef Defensin from Avocado (*Persea Americana* Var. *Drymiifolia*) Is Cytotoxic to K562 Chronic Myeloid Leukemia Cells through Extrinsic Apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 99, 10–18. doi:10.1016/j.biocel.2018.03.013

Gambacorta, V., Gnani, D., Vago, L., and Di Micco, R. (2019). Epigenetic Therapies for Acute Myeloid Leukemia and Their Immune-Related Effects. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 207. doi:10.3389/fcell.2019.00207

Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L. M., Salgado-Garcigla, R., Rodríguez-Zapata, L. C., Ochoa-Zarzosa, A., et al. (2013).

Antibacterial Activity of Defensin PaDef from Avocado Fruit (*Persea Americana* Var. *Drymiifolia*) Expressed in Endothelial Cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biomed. Res. Int.* 2013, 986273. doi:10.1155/2013/986273

Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garcigla, R., Ochoa-Zarzosa, A., and López-Meza, J. E. (2016). The Defensin from Avocado (*Persea Americana* Var. *Drymiifolia*) PaDef Induces Apoptosis in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Biomed. Pharmacother.* 82, 620–627. doi:10.1016/j.biopha.2016.05.048

Guzmán-Rodríguez, J. J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., and López-Meza, J. E. (2015). Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1–11. doi:10.1155/2015/735087

Hajji, N., García-Domínguez, D. J., Hontecillas-Prieto, L., O'Neill, K., de Álava, E., and Syed, N. (2021). The Bitter Side of Epigenetics: Variability and Resistance to Chemotherapy. *Epigenomics* 13, 397–403. doi:10.2217/epi-2017-0112

Hancy, E. F., Mansour, S. C., and Hancock, R. E. W. (2017). "Antimicrobial Peptides: an Introduction," in *Antimicrobial Peptides*. Hatfield. Editor PR Hansen (Hertfordshire, UK: Human Press), 3–22. doi:10.1007/978-1-4939-6737-7_10.1007/978-1-4939-6737-7_1

Hazlett, L., and Wu, M. (2011). Defensins in Innate Immunity. *Cell Tissue Res* 343, 175–188. doi:10.1007/s00441-010-1022-4

Hontecillas-Prieto, L., Flores-Canpos, R., Silver, A., de Álava, E., Hajji, N., and García-Domínguez, D. J. (2020). Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Front. Genet.* 11, 578011. doi:10.3389/fgene.2020.578011

Huang, P.-H., Chen, C.-H., Chou, C.-C., Sargeant, A. M., Kulp, S. K., Teng, C.-M., et al. (2011). Histone Deacetylase Inhibitors Stimulate Histone H3 Lysine 4 Methylation in Part via Transcriptional Repression of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *Mol. Pharmacol.* 79, 197–206. doi:10.1124/mol.110.067702

Hull, E. E., Montgomery, M. R., and Leyva, K. J. (2016). HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *Biomed Res Int* 2016, 1–15. doi:10.1155/2016/8797206

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2020). Childhood Cancer and Leukemia International Consortium. Available at: <https://clic.iarc.fr/> (Accessed March 24, 2020).

Janssens, Y., Wynendaele, E., Vanden Berghie, W., and De Spiegdeleer, B. (2019). Peptides as Epigenetic Modulators: Therapeutic Implications. *Clin. Epigenet* 11, 1. doi:10.1186/s13148-019-0700-7

Kelly, A. D., and Issa, J.-P. J. (2017). The Promise of Epigenetic Therapy: Reprogramming the Cancer Epigenome. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 42, 68–77. doi:10.1016/j.gde.2017.03.015

Lakshmaiah, K. C., Jacob, L. A., Aparna, S., Lokanatha, D., and Saldanha, S. C. (2014). Epigenetic Therapy of Cancer with Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Cancer Res. Ther.* 10, 469–478. doi:10.4103/0973-1482.137937

Li, Y., and Seto, E. (2015). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 6, a026831. doi:10.1101/cshperspect.a026831

- Mohammad, R. M., Mugbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T., et al. (2015). Broad Targeting of Resistance to Apoptosis in Cancer. *Semin. Cancer Biol.* 35, S78. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.001
- Parisi, K., Shafoe, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Blackley, M. R., Anderson, M. A., et al. (2019). The Evolution, Function and Mechanisms of Action for Plant Defensins. *Semin. Cell Develop. Biol.* 88, 107–118. doi:10.1016/j.semcdb.2018.02.004
- Paul, S., Kantarjian, H., and Jabbour, E. I. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin. Proc.* 91, 1645–1666. doi:10.1016/j.mayocp.2016.09.010
- Ren, S. X., Cheung, A. S. L., To, K. F., Tong, J. H. M., Li, M. S., Sken, J., et al. (2012). Host Immune Defense Peptide IL-37 Activates Caspase-independent Apoptosis and Suppresses Colon Cancer. *Cancer Res.* 72, 6512–6523. doi:10.1158/0008-5472.CCR-12-2359
- Roberts, K. G. (2018). Genetics and Prognosis of ALL in Children vs Adults. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2018, 137–145. doi:10.1182/asheducation-2018.1.137
- Ruefä, A. A., Auserferchner, M. J., Bernhard, D., Sutton, V. R., Tainton, K. M., Kotler, R., et al. (2001). The Histone Deacetylase Inhibitor and Chemotherapeutic Agent Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Induces a Cell Death Pathway Characterized by Cleavage of Bid and Production of Reactive Oxygen Species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10833–10838. doi:10.1073/pnas.191208598
- Salgado Lora, M. G., Medina Estrada, I., López Meza, I. E., and Ochoa Zarzosa, A. (2020). Prolactin and Estradiol Are Epigenetic Modulators in Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Infection. *Pathogens* 9, 520. doi:10.3390/pathogens9070520
- Sanders, Y. Y., Tollerfsbol, T. O., Varisco, B. M., and Hagoood, J. S. (2011). Epigenetic Regulation of Thy-1 by Histone Deacetylase Inhibitor in Rat Lung Fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 16–23. doi:10.1165/rcmb.2010-0154OC
- Sinha, R., and Shukla, P. (2019). Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives. *Pol.* 26, 79–87. doi:10.2174/0929866525666181026160852
- Starr, C. G., and Wimley, W. C. (2017). Antimicrobial Peptides Are Degraded by the Cytosolic Proteases of Human Erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* 1859, 2319–2326. doi:10.1016/j.bbamem.2017.09.008
- Sun, Y., Bao, X., Ren, Y., Jia, L., Zou, S., Han, J., et al. (2019). Targeting HDAC/OAZ1 axis with a Novel Inhibitor Effectively Reverses Cisplatin Resistance in Non-small Cell Lung Cancer. *Cell Death Dis.* 10, 400. doi:10.1038/s41419-019-1597-y
- Terwilliger, T., and Abdul-Hay, M. (2017). Acute Lymphoblastic Leukemia: a Comprehensive Review and 2017 Update. *Blood Cancer J.* 7, e577. doi:10.1038/bcj.2017.53
- Valdez, B. C., Brammer, J. E., Li, Y., Murray, D., Liu, Y., Hosing, C., et al. (2015). Romidepsin Targets Multiple Survival Signaling Pathways in Malignant T Cells. *Blood Cancer J.* 5, e357. doi:10.1038/bcj.2015.83
- Van Zoged, H., Carpentier, G., Dos Santos, C., Hamma-kourbali, Y., Courty, I., Aniche, M., et al. (2012). Antitumor and Angiostatic Activities of the Antimicrobial Peptide Dermaseptin B2. *PLoS One* 7, e44351. doi:10.1371/journal.pone.0044351
- Wan, X., Liu, H., Sun, Y., Zhang, J., Chen, X., and Chen, N. (2017). Ixrasin: A Promising Polypeptide for the Prevention and Treatment of Cancer. *Oncol. Lett.* 13, 3997–4001. doi:10.3892/ol.2017.6017
- Wong, J. H., Zhang, X. Q., Wang, H. X., and Ng, T. B. (2006). A Mitogenic Defensin from white cloud Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Peptides* 27, 2075–2081. doi:10.1016/j.peptides.2006.03.020
- Wu, C., and Li, W. (2018). Genomics and Pharmacogenomics of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Crit. Rev. Oncology/Hematology* 126, 100–111. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.04.002

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

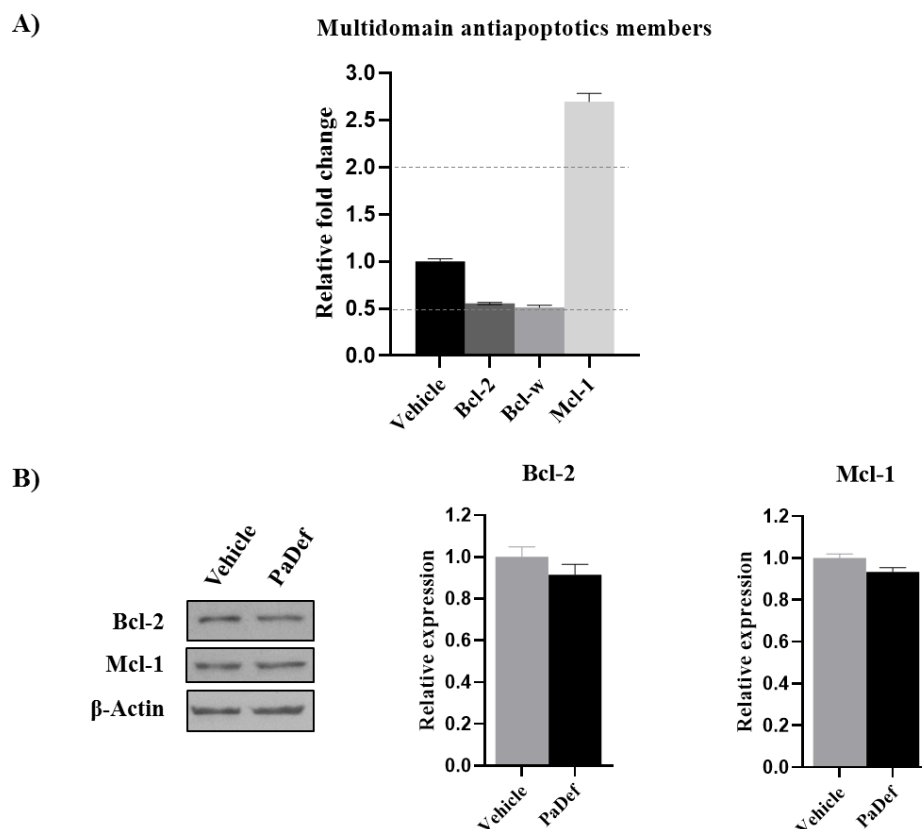
Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Jiménez-Acantar, López-Gómez, López-Meza and Ochoa-Zarzosa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

COMPLEMENTARY RESULTS

As part of the activation of apoptosis through the intrinsic pathway, we evaluated the expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes of the Bcl-2 family. Figure 1SA shows the expression of genes corresponding to the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-w, and Mcl-1). We observed an increase in the expression of Mcl-1 (~ 2.5-fold). However, anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1 analyzed by Western blotting were not modified (Figure 1SB).

Also, the expression of pro-apoptotic genes of the Bcl-2 family was analyzed. These were classified as multidomain (Bak, Bax, and Bok) and those containing only the BH3 domain (Bid, Bim, Bik, and Bad). The results showed that PaDef increases the expression of the multidomain gene Bax and the single BH3 domain gene Bik (Figure 1SC and D).



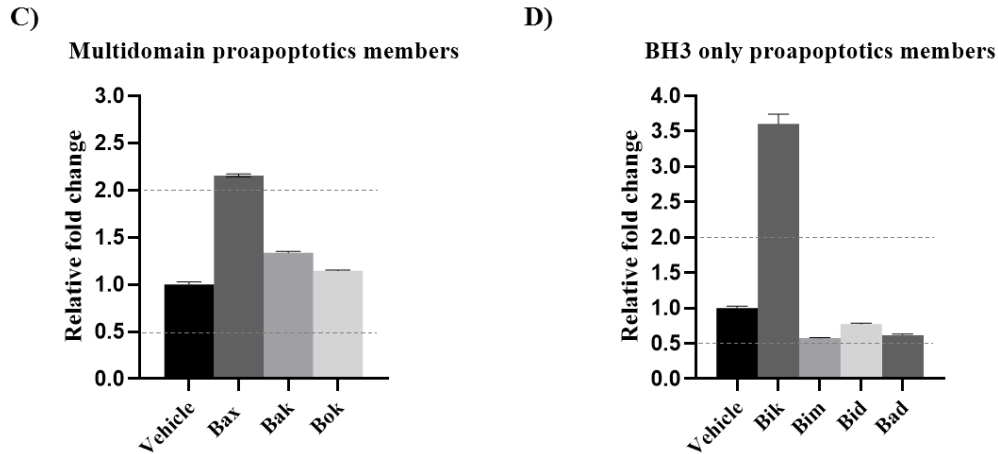


Figure 1S. PaDef induces the expression of pro-apoptotic Bcl-2 family genes in the Jurkat cell line. Cells were treated with PaDef IC₅₀ (47.3 μ M) or vehicle (DMSO 0.98%) for 24 h. mRNA expression was analyzed by RT-qPCR. Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of three independent experiments. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered significant for differentially expressed mRNAs.

In addition, we analyzed whether the cytotoxic effect of PaDef could be related to cell cycle modifications; this assay was performed through flow cytometry. Jurkat cells were treated for 24 h with γ -thionin (47.3 μ M), vehicle (DMSO, 0.98 %), or Act-D (0.5 μ M). The results showed that PaDef does not affect the cell cycle (Figure 2S).

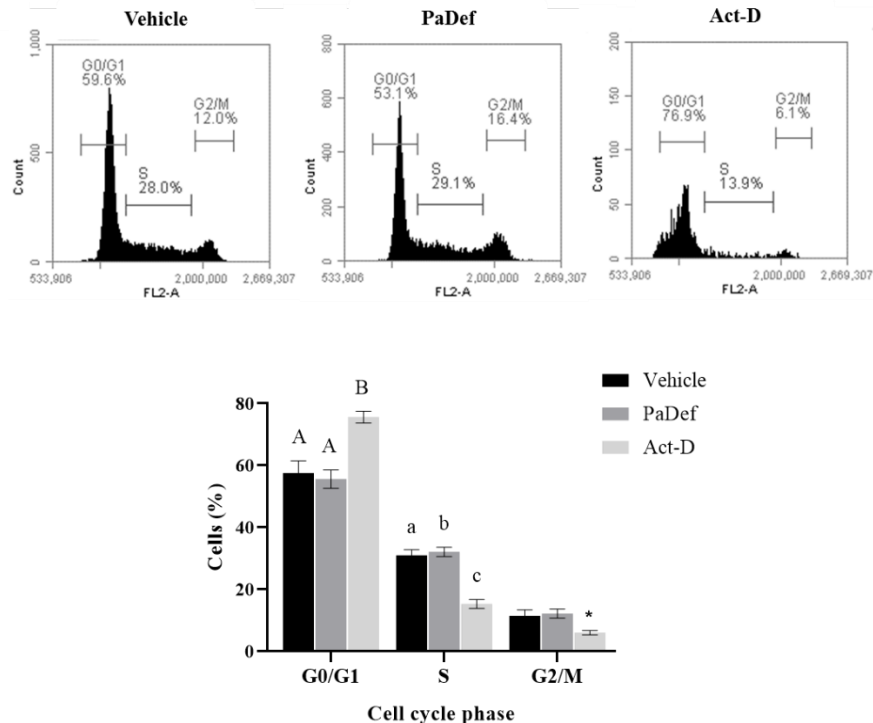


Figure S2. PaDef treatment does not affect cell cycle phases in Jurkat acute lymphoid leukemia cells. Cells were treated with PaDef (47.3 μM), vehicle (DMSO, 0.98 %), or actinomycin D (Act-D, 0.5 μM) for 24 h. Cells were analyzed by flow cytometry with the BD Cycletest Plus DNA kit following the manufacturer's instructions. Two independent experiments were performed in duplicate. Data were compared using one-way ANOVA and Tukey post hoc test ($P < 0.05$).

Previous experiments showed that PaDef treatment of Jurkat cells inhibits the activity of HDACs (Jiménez-Alcántar *et al.*, 2022). However, it is unknown if this inhibition results from direct interaction between these proteins or if there is some other mechanisms of inhibition. Therefore, the coupling potential of class I HDACs (HDAC 1, 2, 3, and 8) with PaDef was analyzed *in silico* using the Autodock vina program. The results indicate that PaDef can bind to class I HDACs with binding free energies (ΔG) from -11 to -13.5 kcal/mol (Figure S3).

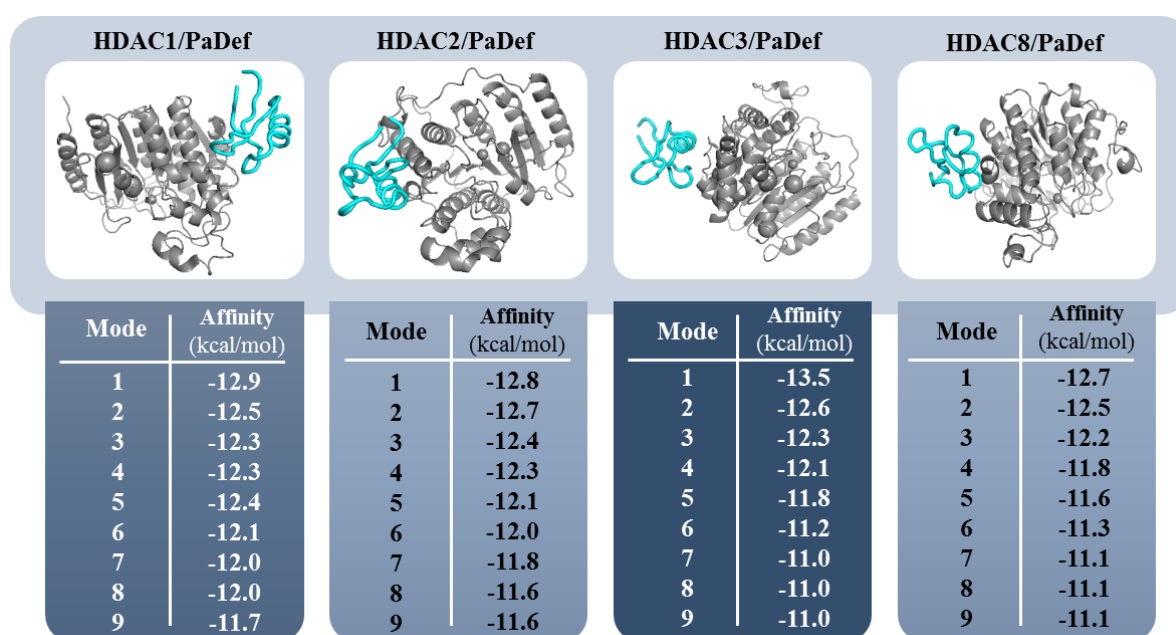


Figure S3. Representative crystal structures of HDAC/PaDef binding and binding free energies. The figure shows the binding free energies (ΔG) of 9 of the possible binding sites of PaDef with class I HDAC (HDAC 1, 2, 3, and 8). Three-dimensional structures of the possible binding corresponding to the most favorable ΔG are shown. The co-crystal complex of human HDAC1 (PDB code: 4bkx.1.B), HDAC2 (PDB code: 3MAX), HDAC3 (PDB code: 4a69) and HDAC8 (PDB code: 1t64) was retrieved from the PDB database. The receptor was prepared using the standard protocol Autodock tools. The water molecules were removed, and hydrogen atoms were added to the protein structure. The peptide was also prepared for the ligand by Autodock tools removing their torsions. The files were saved in pdbqt format for analysis. The molecular docking was carried out on Autodock vina.

Finally, to determine if the increase in histone 3 methylation marks in PaDef treated-Jurkat cells (Jiménez-Alcántar *et al.*, 2022) correlates with the activity of enzymes responsible of removing histone methylation marks, the activity of LDS1 or KDM1A (lysine demethylase 1A) and the Jumonji histone demethylase JMJD2A or KDM4A (lysine demethylase 4A) was assessed. Results showed that there was no change in the enzymatic activity (Figure S4).

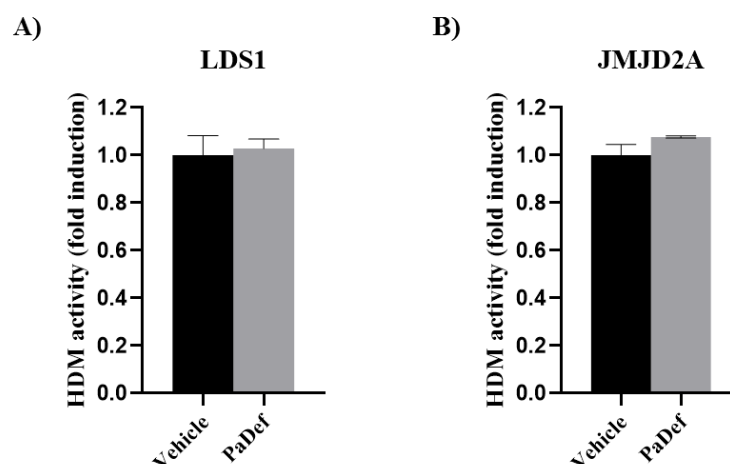


Figure S4. Histone demethylase activity in acute lymphoid leukemia cell line Jurkat treated with PaDef. A) Histone demethylase LDS1 or KDM1A and B) histone demethylase JMJD2A or KDM4A. Jurkat lysates were obtained at 24 h of treatment with PaDef (47.3 μ M) and were incubated with the substrates for LDS1 and Jumonji demethylases (JMJD). Each bar shows the mean HDM activity of cell lysates from one experiment \pm SD in duplicate (n = 2). The expression of control cells (vehicle, DMSO 1 %) was considered as 1 (data normalized).

7.2. CAPÍTULO 2.

The antimicrobial peptide γ -thionin (*Capsicum chinense*) cytotoxic effect in chronic myeloid leukemia and an acute lymphoid leukemia cell lines is associated with global epigenetic modifications in histone 3

Jiménez-Alcántar P., López-Meza J.E. & Ochoa-Zarzoza A.*

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

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

E-mail address: ochoaz@umich.mx, alejandra.ochoa@umich.mx

Correspondence address: 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. E-mail address: ochoaz@umich.mx

Abstract:

During the last decades, there has been a progressive increase in the efficacy of oncological treatments, including treatments for leukemias, which have increased the survival rate of patients. However, treatments are often associated with a series of toxic or side effects that negatively influence patient's quality of life. Also, treatment resistance in patients with leukemia is a recurrent problem that impedes recovery. In this sense, the search for molecules preventing the development of drug resistance or that reverse the epigenetic alterations responsible for the development of resistance to treatments is relevant to improving the leukemia treatments. An attractive alternative is antimicrobial peptides, such as the defensin γ -thionin, which has cytotoxic activity on various cancer cell lines (MCF-7, Caco 2, Jurkat, and K-562). Furthermore, the γ -thionin cytotoxic effect on MCF-7 cells was associated with epigenetic modifications. In this work, we demonstrated that the cytotoxic activity of γ -thionin in the chronic myeloid leukemia cell line K-562 and acute lymphoid leukemia cell line Jurkat is related to global epigenetic modifications in histone 3. We found an increase in global acetylation (\sim 2-fold, for both cell lines) and specific acetylation marks at lysine 9 (H3K9Ac) (\sim 1.5-fold, for both cell lines). In addition, γ -thionin also increased lysine 9 methylation marks. The dimethylation mark (H3K9me2) was increased \sim 3-fold in the Jurkat cell line and \sim 2-fold in the K-562 cell line, while the trimethylation mark (H3K9me3) was increased \sim 2-fold in both cell lines. These data suggest that the epigenetic modulation in histone 3 caused by γ -thionin is associated with its cytotoxic activity in leukemia cells. However, an in-depth study is needed to determine the genes affected by these modifications.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, acute lymphoid leukemia, epigenetic, γ -thionin, defensin

1. Introduction

In recent years, it has been recognized that genetic and epigenetic alterations play a fundamental role in initiating, developing, and maintaining neoplasms such as leukemias. Furthermore, epigenetic alterations are dynamic and reversible, which has led to the search and development of novel therapies against cancer (Fardi *et al.*, 2018). These therapies aim to restore normal epigenetic patterns in neoplastic cells and reduce the occurrence of resistance to conventional treatments such as chemotherapies and clinical recurrence by simultaneously impacting different cellular pathways. However, most of the available epigenetic therapies are nonspecific and show considerable toxicity affecting patients' health directly (Bojang & Ramos, 2013). Therefore, deepening the knowledge of epigenetic alterations in neoplasms and searching for molecules that target epigenetic modifications is a priority in searching for therapies against cancer, specifically against leukemias.

Some antimicrobial peptides of diverse origins, including plant defensins, have been described with cytotoxic activity on cancer cells, including leukemia cell lines. These molecules have an attractive potential as alternative cancer therapies since they are selective toward cancer cells (Guzmán-Rodríguez *et al.*; 2016). However, whether antimicrobial peptides' cytotoxic effect in cancer cell lines was related to global histone epigenetic modifications is unknown. Our working group demonstrated that a plant antimicrobial peptide, defensin γ -thionin, induces apoptosis in the breast cancer cell line MCF-7. Furthermore, this effect was associated with epigenetic modifications in histone 3, specifically in the H3K9Ac mark (Arceo-Martínez *et al.*, 2018). Also, γ -thionin was cytotoxic for K-562 and Jurkat leukemia cell lines through apoptosis. In K-562, apoptosis was activated by a calpain-dependent pathway; meanwhile, in the Jurkat cell line was triggered by the intrinsic or mitochondrial pathway (Flores-Álvarez, 2018). However, whether this effect was also related to global epigenetic modifications was unknown. In this work, we demonstrate that γ -thionin induces global epigenetic changes in histone 3, and these modifications were associated with the cytotoxic effect in the Jurkat cell line.

2. Materials and methods

2.1. Peptide

The peptide used in this work corresponds to the mature region of γ -thionin (QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC, 50 aa), (Genbank AF128239.1). This peptide was chemically synthesized and obtained from BIOMATIK. The peptide at 962 μ M was resuspended in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) and then air oxidized for 5 days at room temperature for disulfide bond formation. The final concentration of vehicle (DMSO) for all of the experiments was 0.98%, which was used as a control. The peptide was used in a concentration range of 9.6–58 μ M, in agreement with the results observed from a previous study in the leukemia cell line K-562 (Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

2.2. Cells cultures

The Human K-562 cell line and the human Jurkat cell line were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 12.5% fetal bovine serum (v/v) (FBS, Corning) and 100 U/mL penicillin and streptomycin (Gibco), in an atmosphere of 5% CO₂ and at 37°C.

2.3. MTT viability assay and determination of the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀)

K-562 cells and Jurkat cells (2×10^4 cells/well) were cultured in 96-well plates and synchronized in RPMI-1640 medium by serum deprivation for approximately 18 h. Cells were then treated with γ -thionin peptide 9.6–58 μ M and DMSO (1.16%, control for K-562 cells and 1% for Jurkat cells) and incubated for 24 h as reported (Flores-Alvarez *et al.*, 2018). After incubation with the treatments, 10 μ L of MTT solution (5 mg/mL, Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS 138mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, and 10mM KH₂PO₄) was added to each well and incubated for 4 h at 37°C. Finally, formazan crystals were dissolved

with acidic isopropanol (100 μ L, 95% isopropanol, and 5% 1N HCl). Absorbance measurements were performed in a microplate reader (Bio-Rad) at 595 nm. Actinomycin D (Act-D, 24 μ M for K-562 cells and 0.5 μ M for Jurkat cells,) (Cayman Chemical) was used as a positive control for cell death. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated by linear regression analysis using the program GraphPad Prism 8. IC_{50} was corroborated by flow cytometric assay using thiazole orange fluorescent and propidium iodide for nucleic acid staining (Invitrogen). For the assay, 8×10^4 cells/well were cultured in 24-well plates and synchronized with serum-free RPMI-1640 medium for 18 h and then treated for 24 h with the IC_{50} and with vehicle (DMSO 1.16% for K-562 cells or 1% for Jurkat cells). Finally, cells were stained with the fluorochromes according to the manufacturer's instructions and analyzed in a BD Accuri™ C6 cytometer (BD Biosciences). The IC_{50} corroborated in this assay was used for the rest of the experiments.

2.4 Histone extraction and western blot analysis

Cells (1×10^6 cells) were synchronized for 18 h by serum deprivation, then treated with γ -thionin 50.3 μ M for K-562 cells and 47 μ M for Jurkat cells, and vehicle (DMSO 1.16% for K-562 cells and 1% for Jurkat cells) for 24 h. Then, they were washed 2 times with cold PBS and proceeded to histone extraction by acid extraction (Salgado-Lora *et al.*, 2020). For this, the cells were resuspended in 1.5 mL of H-lysis solution (0.25M sucrose, 3 mM $CaCl_2$, 1mM Tris pH 8, and 0.5% NP-40) and shook. Subsequently, the cell pellet was washed with 1 mL of H-wash solution (300mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5mM DTT and 0.5% NP-40). Histone extraction was performed with the addition of 200 μ L of H-extraction solution (0.5 M HCl, 10% glycerol, and 0.1M 2-mercaptoethylamine-HCl), incubated on ice for 30 min. Further, cells were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, the supernatant was recovered, and cold acetone was added 1:5 ratio. Histones were allowed to precipitate for 5 days under refrigeration. The precipitate was recovered by centrifugation (13,000 rpm for 10 min), dissolved in 20 μ L of sterile deionized water, and stored at $-80^\circ C$ until use.

For western blot analysis, histone samples were separated by electrophoresis on a 15% SDS-PAGE gel and then transferred to a PVDF membrane using a semi-dry transfer unit (Fisher

Scientific). For this, the gel was equilibrated for 15 min in transfer solution III (0.3M Tris pH 10.4) and the membrane (previously hydrated in methanol) in solution II (0.25M Tris pH 10.4). The transfer sandwich was assembled and allowed to run at 15 V for 1 h. The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk powder dissolved in cold PBS and left at 4°C overnight. The membranes were washed three times with cold TBS, and then the primary antibody (1:1,000) was added and incubated at 4°C overnight. The following antibodies against specific histone modifications were used: global acetylation (H3K9, K14, K18, K23, K27) (Abcam ab47915), H3K9ac (Abcam, ab10812), for acetylation, H3K9me2 (Abcam Ab1220), and H3K9me3 (Abcam, ab8898) for di- and tri-methylation, respectively. Antibody for histone H3 (Abcam, ab1791) was used for loading control. Subsequently, the membranes were incubated for 2 h at 4°C with horseradish peroxidase-coupled anti-IgG secondary antibody (1:3,000) (Cell Signaling Technology). The membranes were washed three times, and 100 µL of Western ECL substrate was added. Finally, the membranes were placed between two plastic sheets and exposed to an X-ray plate. The plate was manually developed in the dark. The intensity of the signals was quantified by densitometry with ImageJ software. Sodium butyrate (3.5 mM) was used as a positive control for H3K9 acetylation induction and negative for H3K9me2/3 methylation induction. Data were normalized based on H3 and presented as the relative level of expression for the vehicle.

2.5 Histone demethylase (HDM) activity assay

We employed a kit from Thermo Fisher (Cat. EIAHDMF) to measure the activity of LSD1 and Jumonji family demethylases (HDMs) in K-562 cells treated with the peptide γ -thionin (50.3 µM for K-562 cells and 47 µM for Jurkat cells) and vehicle (DMSO, 1.16% for K-562 cells and 1% for Jurkat cells). Cells were grown in plates of 96 wells and treated as γ -thionin for 24h. Cell lysates were obtained with 25 µL of the Tris-based buffer for cell lysis provided with the kit. Then, we added the enzymatic reaction mix (supplied with the kit) containing 25 µL of JMJD2A (Jumonji family enzyme) to 50 µL of a 2mM ascorbate, 100µM FeSO₄ solution, and 25 µL of a specific sequence of Histone H3 with the trimethylated lysine at amino acid 9 (H3K9me3) containing 2mM alpha-ketoglutarate plus all cofactors and inhibitors dissolved in Jumonji-type Assay Buffer. The plate was incubated for 1 h at 30°C.

Finally, 25 μL of formaldehyde reagent was added to each well. Plates were incubated for 30min at 37°C. A standard curve with formaldehyde was running in parallel. Demethylase reaction final volume was 100 μL in each well. The product of the enzymatic demethylation reactions is formaldehyde, which was quantitated directly by a fluorescent product with a Varioskan (Thermo Scientific) plate reader (450 nm excitation, 510 nm emission). HDM activity was calculated considering the effect of the vehicle as basal activity (normalized to 1-fold).

2.6. Statistical analysis

Viability assays were analyzed with PRISM 8.0.2 software by performing a one-way analysis of variance (one-way ANOVA) and using the post hoc Tukey test. The results are reported as the mean \pm the standard errors (SE), and the significance level was set at $p \leq 0.05$. On the other hand, the Student's t-test was used for western blot analysis with a significance level of $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. The antimicrobial peptide γ -thionin is cytotoxic to K-562 chronic myeloid leukemia cells and Jurkat acute lymphoid leukemia

The effect of γ -thionin on the viability of the K-562 and Jurkat cell lines was analyzed by MTT assay. Increasing peptide concentrations (9.6, 19.2, 38.5, and 58 μM) were used for 24 h. Figure 1A and 2A show that the cytotoxic effect of the peptide on the K-562 and Jurkat cell lines was in a concentration-dependent manner. From these results, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) calculated was 50.3 μM for the K-562 cell line (figure 1B) and 47 μM for the Jurkat cell line (figure 2B) and corroborated by flow cytometry (figure 1C and 2C). Therefore, for the rest of the experiments, the IC_{50} value was used. Also, cell morphology was analyzed by microscopy, and evident alterations were observed in both cells treated with γ -thionin and actinomycin D (figures 1D and 2D).

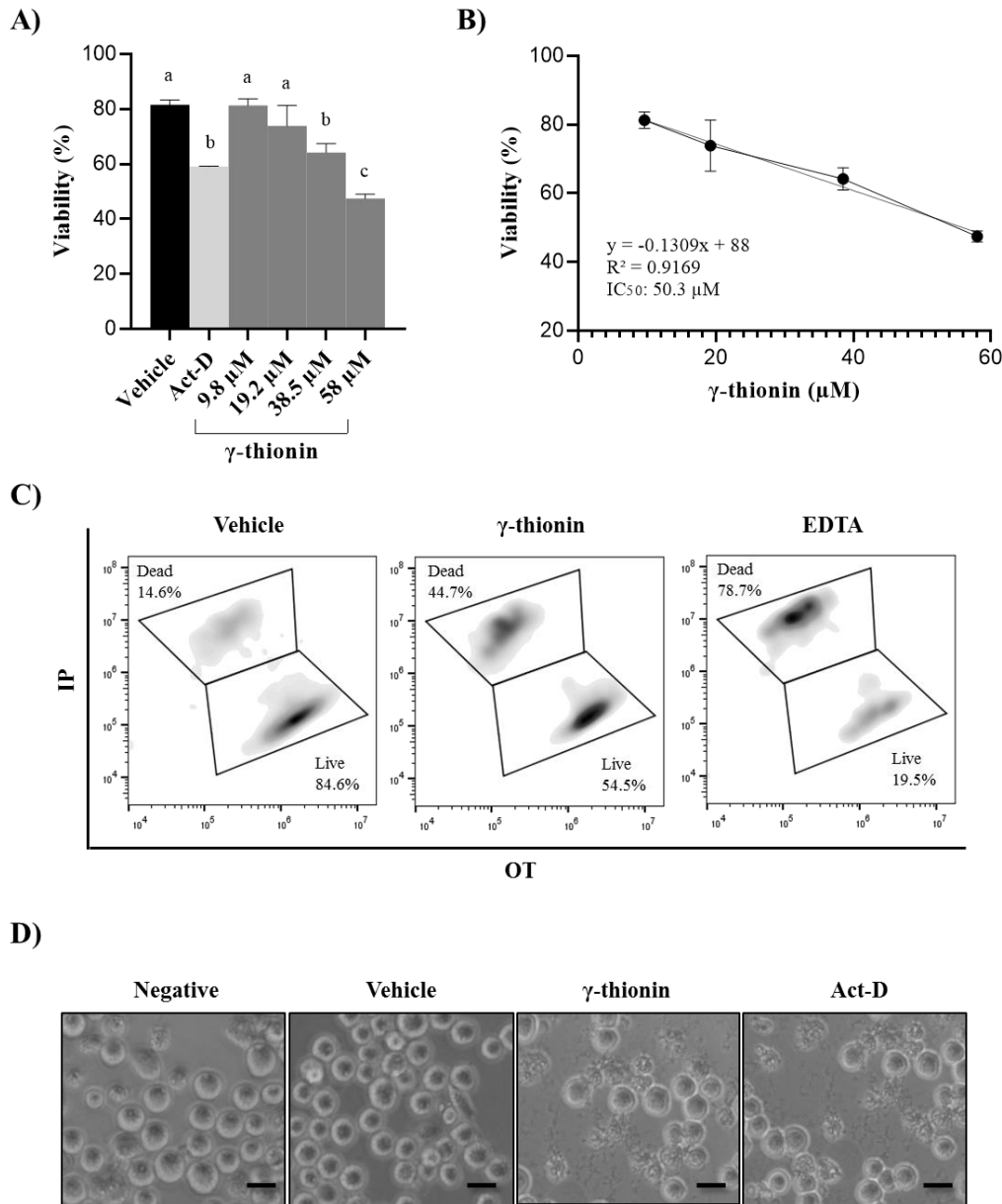


Figure 1. The antimicrobial peptide γ -thionin is cytotoxic to K-562 chronic myeloid leukemia cells. (A) Effect of γ -thionin on the viability of K-562 cells. Cells were treated with increasing peptide concentrations (9.6, 19.2, 38.5, and 58 μ M) for 24 h and analyzed by MTT. The data show the percentage of cell viability. DMSO (1.16%) was used as a vehicle and actinomycin D 24 μ M (Act-D) as a positive control of death. Data represent the mean of three independent experiments performed in triplicate. Different letters denote significant differences within the treatments (one-way ANOVA and Tukey's comparison, $p \leq 0.05$). (B) The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated by linear regression analysis; IC_{50} : 50.3 μ M; $R^2 = 0.9169$. (C) Evaluation of γ -thionin IC_{50} by flow cytometry. DMSO (1.16%) was used as a vehicle and EDTA 15 mM as a positive death control. Representative plots of the different treatment conditions are shown. Cells were treated as described in the MTT assay, and 10,000 events were analyzed. (D) Cell morphology of K-562 after 24 h of treatment. Representative photographs taken by light-field microscopy are shown. Vehicle (DMSO 1.16%), PaDef 50.3 μ M, and actinomycin D (Act-D) 24 μ M. Scale bar 20 μ M.

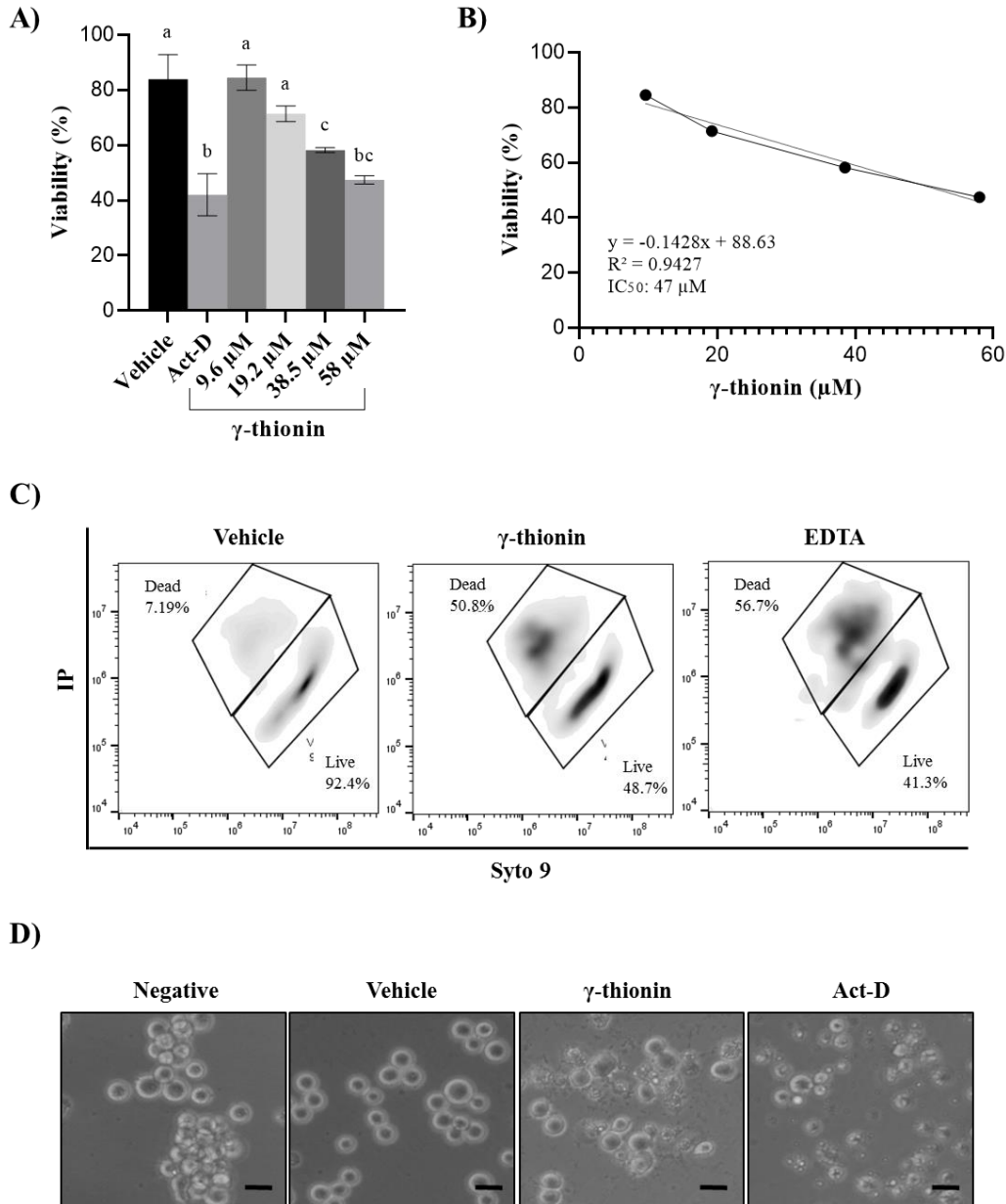


Figure 2. The antimicrobial peptide γ -thionin is cytotoxic to Jurkat acute lymphoid leukemia cells. (A) Effect of γ -thionin on the viability of Jurkat cells. Cells were treated under increasing peptide concentrations (9.6, 19.2, 38.5, and 58 μ M) for 24 h and analyzed by MTT. The data show the percentage of cell viability. DMSO (1 %) was used as a vehicle and actinomycin D 0.5 μ M (Act-D) as a positive control of death. Data represent the mean of three independent experiments performed in triplicate. Different letters denote significant differences within the treatments (one-way ANOVA and Tukey's comparison, $p \leq 0.05$). (B) The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated by linear regression analysis; IC_{50} : 47 μ M; $R^2 = 0.9427$. (C) Evaluation of γ -thionin IC_{50} by flow cytometry. DMSO (1%) was used as a vehicle and EDTA 15 mM as a positive death control. Representative plots of the different treatment conditions are shown. Cells were treated as described in the MTT assay, and 10,000 events were analyzed. (D) Cell morphology of Jurkat after 24 h of treatment. Representative photographs taken by light-field microscopy are shown. Vehicle (DMSO 1 %), PaDef 47 μ M and actinomycin D (Act-D) 0.5 μ M. Scale bar 20 μ M.

3.1. γ -thionin induces global epigenetic modifications in histone 3 in the K-562 and Jurkat cell lines

We analyze whether the cytotoxic effect of γ -thionin on the leukemia cell lines K562 and Jurkat was related to epigenetic modifications. The following epigenetic marks on histone 3 were analyzed: global acetylation (H3K9, K14, K18, K23, K27), lysine 9 acetylation (H3K9Ac), lysine 9 trimethylation (H3K9me3), lysine 9 dimethylation (H3K9me2), lysine 4 trimethylation (H3K4me3) and serine 10 phosphorylation (H3S10P). The results showed that in the K-562 cell line, γ -thionin up-regulates (\sim 2-fold) the global H3 acetylation (figure 3A) and the H3K9Ac marks (\sim 1.5-fold) (figure 3B). Besides, in the Jurkat cell line, γ -thionin up-regulates (\sim 2-fold) the global H3 acetylation (figure 3A) and the H3K9Ac marks (\sim 1.5-fold) (figure 3B).

In addition, γ -thionin increases histone 3 lysine 9 (H3K9me) methylation marks. Furthermore, it up-regulates \sim 2-fold dimethylation and trimethylation marks (figure 4A and B, respectively) in the K-562 cell line. Also, γ -thionin in Jurkat cells increases \sim 3-fold the H3K9me2 mark and \sim 2-fold the H3K9me3 mark (figure 4A and B, respectively).

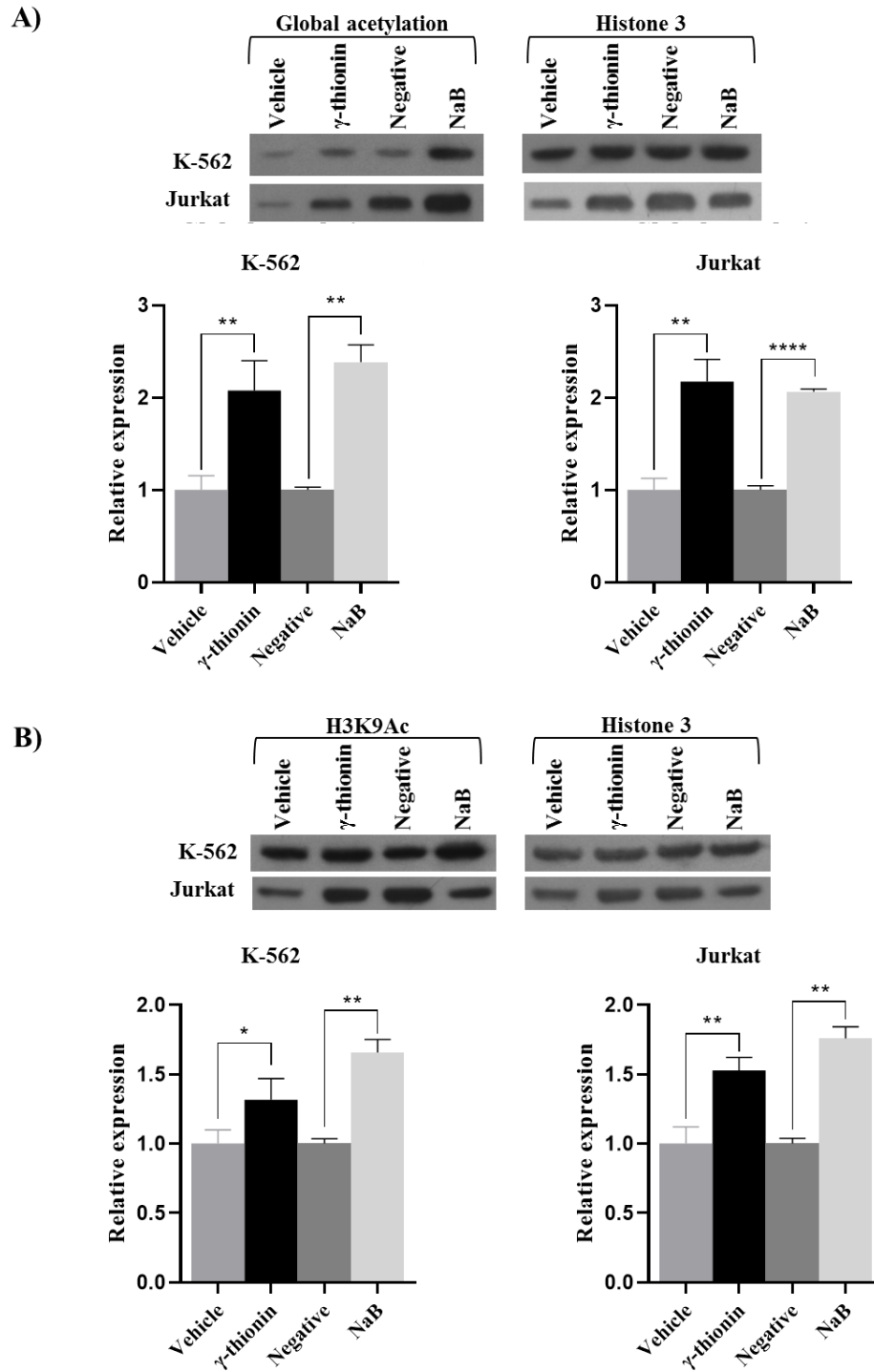


Figure 3. γ -thionin treatment increases histone 3 acetylation in chronic myeloid leukemia line K-562 and acute lymphoid leukemia Jurkat. A) Global acetylation marks (H3K9, K14, K18, K23, K27) and B) Acetylation mark of lysine 9 (H3K9Ac). A representative Western blot image is shown at the top of each section. Histones were extracted from cells treated for 24 h with γ -thionin (50.3 μ M for K-562 and 47 μ M for Jurkat), vehicle (DMSO, 1.16 % for K-562 and 1 % for Jurkat). Proteins were separated by SDS-PAGE and Western transfer assays were performed. Densitometric analysis plots corresponding to Western blot are shown at the bottom of each section. Histone 3 levels were

used as a loading control. Values of γ -thionin were normalized to the vehicle (DMSO), and NaB values were normalized to untreated cells (negative). $p \leq 0.05$ indicate significant statistical differences based on Student's t-test concerning the vehicle. $n=3$. Values represent the mean \pm SE of three independent experiments.

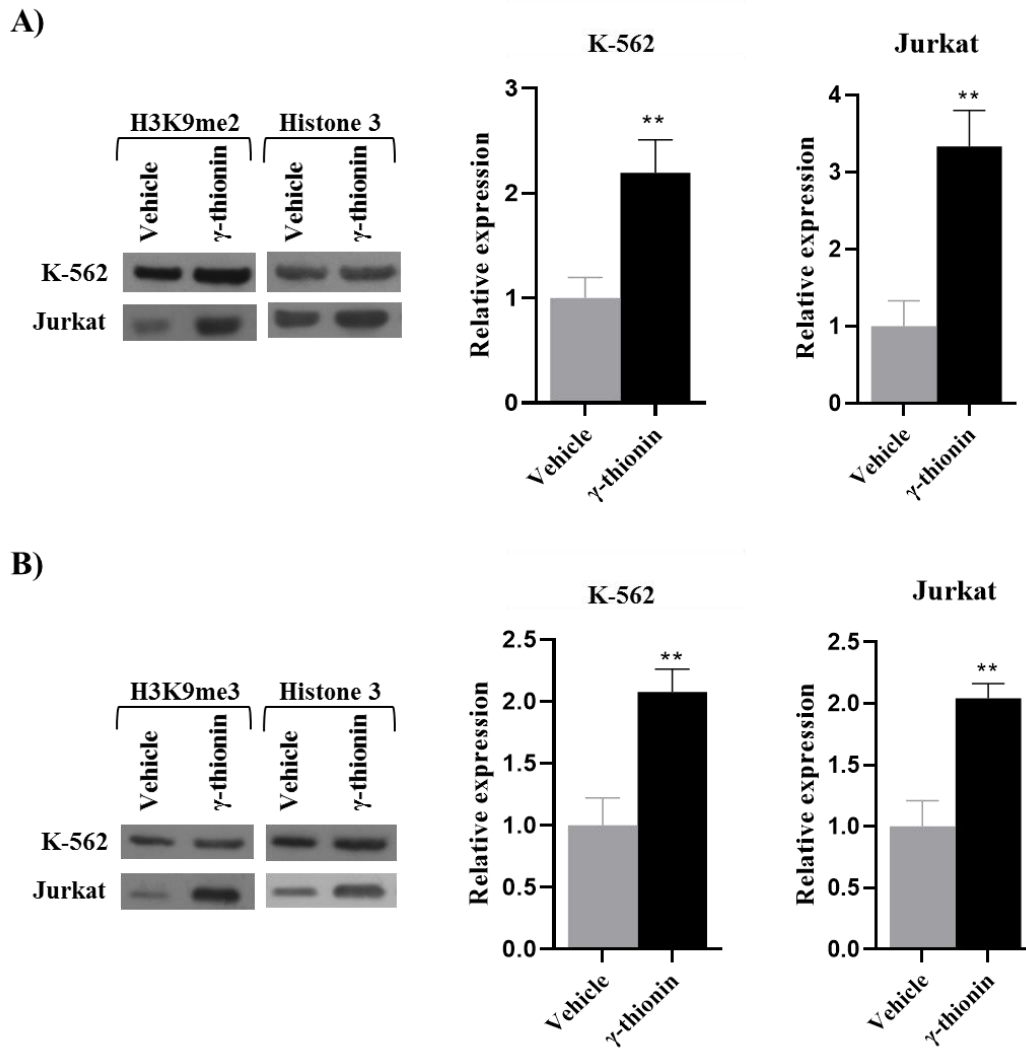


Figure 4. γ -thionin treatment increases histone 3 methylation in the chronic myeloid leukemia line K-562 and acute lymphoid leukemia Jurkat. A) Lysine 9 dimethylation mark (H3K9me2) and B) Lysine 9 trimethylation mark (H3K9me3). A representative Western blot image is shown at the top of each section. Histones were extracted from cells treated for 24 h with γ -thionin (50.3 μ M for K-562 and 47 μ M for Jurkat), vehicle (DMSO, 1.16 % for K-562 and 1 % for Jurkat). Proteins were separated by SDS-PAGE, and Western assays were performed. Densitometric analysis plots corresponding to Western blot are shown at the bottom of each section. H3 levels were used as a loading control. Values of γ -thionin were normalized to the vehicle (DMSO), and NaB values were normalized to untreated cells (negative). $p \leq 0.01$ indicates significant statistical differences based on Student's t-test concerning the vehicle. $n=3$. Values represent the mean \pm SE of three independent experiments.

To corroborate whether the increase in histone 3 methylation marks was related to the inhibition of activity of histone demethylases (HDM) enzymes (enzymes responsible for removing methylation marks on histones), the activity of two histone demethylases was assessed: LDS1 or KDM1A (lysine demethylase 1A) and the Jumonji histone demethylase JMJD2A or KDM4A (lysine demethylase 4A). In both cases, K-562 and Jurkat cells were treated for 24 h with γ -thionin and vehicle (DMSO). Then the corresponding lysates were obtained to measure the activity of the demethylases. Depending on the case, the results show 15 to 20% inhibition of demethylases (figure 5). The only issue that remained without apparent changes was the activity of the enzyme LDS1 in the Jurkat cells treated with γ -thionin. However, since this was a single duplicate experiment, it is necessary to re-evaluate the activity of these demethylases to corroborate the significance of the decrease in activity.

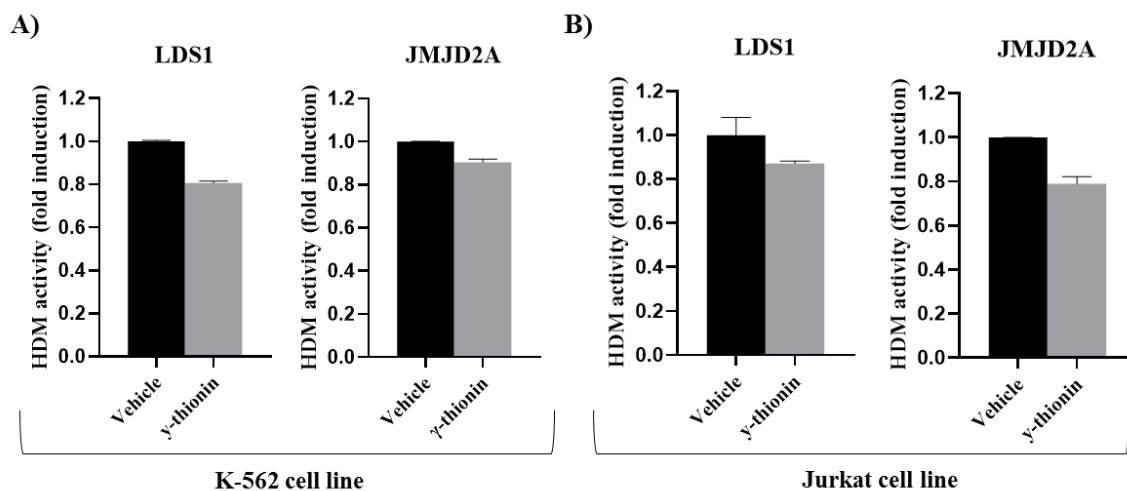


Figure 5. The activity of histone deacetylases in chronic myeloid leukemia K-562 and acute lymphoid leukemia Jurkat cells treated with γ -thionin. A/B) Histone demethylase LDS1 or KDM1A and histone demethylase JMJD2A or KDM4A. Lysates were extracted from cells treated 24 h with γ -thionin (50.3 μ M for K-562 and 47 μ M for Jurkat), vehicle (DMSO, 1.16 % for K-562 and 1 % for Jurkat) and were incubated with the substrates for LSD1 and Jumonji demethylases (JMJD). Each bar shows the mean of HDM activity of cell lysates from one experiment \pm SE which were run in duplicate ($n = 2$), considering the expression of control cells (vehicle) as 1 (data normalized).

Additionally, two more epigenetic marks on histone 3 were analyzed: trimethylation of lysine K4 (H3K4me3) and phosphorylation of serine 10 (H3S10P). However, treatment with γ -thionin did not modify these marks in the both cell lines (figure 6).

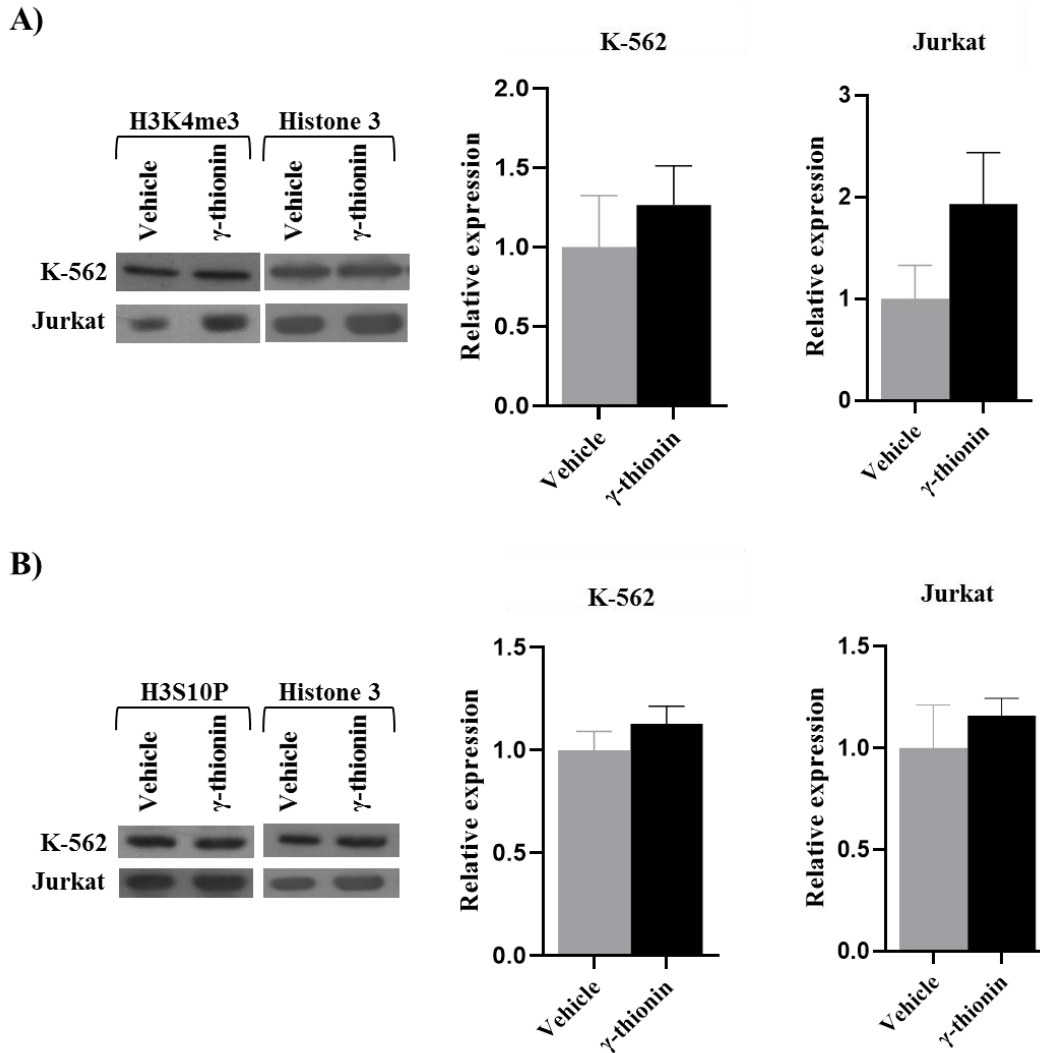


Figure 6. γ -thionin treatment does not modify lysine 4 methylation marks or histone 3 serine 10 phosphorylation in chronic myeloid leukemia K-562 and acute lymphoid leukemia Jurkat cells. A) Lysine 4 trimethylation mark (H3K4me3) and B) Serine 10 phosphorylation mark (H3S10P). A representative Western blot image is shown at the top of each section. Histones were extracted from cells treated for 24 h with γ -thionin (50.3 μ M for K-562 and 47 μ M for Jurkat), vehicle (DMSO, 1.16 % for K-562 and 1 % for Jurkat). Proteins were then separated by SDS-PAGE and Western transfer assays were performed. Densitometric analysis plots corresponding to Western transfer analysis are shown at the bottom of each section. H3 levels were used as a loading control. Values of γ -thionin were normalized to the vehicle (DMSO), and NaB values were normalized to untreated cells (negative). n= 3. Values represent the mean \pm SE of three independent experiments.

4. Discussion

Epigenetic alterations in histones play an essential role in developing and maintaining diseases such as cancer. Methylation and acetylation modifications are widely studied and crucial for gene regulation, so alterations in these marks can alter the expression of multiple genes that help in the development and maintenance of cancer. The search for molecules capable of reversing these alterations is an attractive alternative for cancer treatment.

In the present work, the IC_{50} s of the defensin γ -thionin were determined in the acute lymphoid leukemia Jurkat ($IC_{50} = 47\mu\text{M}$) and chronic myeloid leukemia K-562 ($IC_{50} = 50.3\ \mu\text{M}$) cell lines; in both cases, the effect was concentration-dependent. For K-562, there was a previous report of the cytotoxic activity of γ -thionin with an IC_{50} of $50.26\ \mu\text{M}$ through a calpain-dependent apoptotic-like process (Flores-Alvarez, 2018). The IC_{50} was re-calculated due to a change in the cell line. These determinations allowed using the appropriate concentrations to correlate the cytotoxic effect of γ -thionin to epigenetic modulations.

As for its epigenetic activity, γ -thionin increased histone 3 acetylation and methylation marks in K-562 and Jurkat cell lines. The global acetylation and specific H3K9Ac mark were increased in both cell lines. In addition, histone 3 methylation marks were also increased; specifically, γ -thionin increased the H3K9me2 mark ~ 3 -fold in the Jurkat cell line and ~ 2 -fold in the K-562 cell line. In turn, the H3K9me3 mark was increased ~ 2 -fold in both cell lines. However, it is necessary to identify whether, as occurred with PaDef (Chapter 1), the increase in acetylation marks is related to an inhibition of HDACs (histone deacetylase inhibitors) and whether the changes in epigenetic methylation marks could also be related to changes in the enzymes responsible for histone methylation marks, this could give us a broader picture of how γ -thionin is exerting its effect.

In cancer, dysregulation is generated at various epigenetic levels (DNA methylation, miRNAs, chromatin remodelers, and covalent modifications in histones). In the case of those in which changes are generated at the histone level, various processes are altered that can lead to the inactivation of tumor suppressor genes or activation of oncogenes (Audia & Campbell, 2016). The recovery of altered cell phenotypes through epigenetic modifications

is possible because, unlike genetic mutations, epigenetic alterations are reversible, making searching for molecules with epigenetic activity in cancer attractive as an alternative treatment for these diseases.

5. Conclusion

The γ -thionin defensin increases the overall level of acetylation as well as the specific marks on histone 3 (H3K9Ac, H3K9me2, and H3K9me3) in the K-562 chronic myeloid leukemia and the Jurkat acute lymphoid leukemia cell lines. These results may be associated with their cytotoxic activity in both cell lines. However, further evaluation is necessary to determine how γ -thionine activity is related to increased epigenetic marks.

6. References

- Arceo-Martínez, M. T., Guzmán-Rodríguez, J., Palomera-Sánchez, Z., Ochoazarzosa, A., and López-Meza, J. E. “Defensin γ -Thionin from *Capsicum Chinense* Induce Apoptosis in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 and Regulate Histone H3 Epigenetic Modifications,” in Proceedings of the ASBMB Conference presentation Convention Experimental Biology (EB), San Diego, CA, United States, April 2018.
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(4), a019521. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>
- Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, Strathdee CA, Dempster J, Lyons NJ, Burns R, Nag A, Kugener G, Cimini B, Tsvetkov P, Maruvka YE, O'Rourke R, Garrity A, Tubelli AA, Bandopadhyay P, Tsherniak A, Vazquez F, Wong B, Birger C, Ghandi M, Thorner AR, Bittker JA, Meyerson M, Getz G, Beroukhi R, Golub TR. (2018) Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*. 560(7718):325-330. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0409-3>.

-
- Bojang P. & Ramos K. S. (2013). The Promise and Failures of Epigenetic Therapies for Cancer Treatment. *Cancer Treat Rev.* 40(1). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.05.009>
- Fardi M., Solali S. & Hagh M.F. (2018). Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes & Diseases.* 5(4): 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.06.003>
- Flores-Alvarez, L. J., Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2018). PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var . *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 99, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.013>
- Flores-Álvarez L.J. (2018) Mecanismos de citotoxicidad de péptidos antimicrobianos de origen vegetal contra la línea celular de leucemia mieloide crónica K-562. [Tesis doctoral, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio UMSNH <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/>
- Guzmán-rodríguez, J. J., López-gómez, R., Salgado-garciglia, R., Ochoa-zarzosa, A., & López-meza, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var . *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 82, 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>

7.3. CAPÍTULO 3.
¿Cómo afecta nuestra salud lo que mamá comió durante el embarazo?

Obesidad: ¿Cómo afecta nuestra salud lo que mamá comió durante el embarazo?

Paola Jiménez Alcántar, Alejandra Ochoa Zarzosa

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México.
Contacto: paolyia@gmail.com

Resumen: En México, la ENSANUT (2018) informa que la población de 0 a 19 años con obesidad y sobrepeso, oscila entre 8.2 y 38.4% de acuerdo a los rangos de edad estudiados, mientras que en la población mayor a los 20 años, el 75.2% sufren obesidad o sobrepeso. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Esta condición puede ser desencadenada por el consumo excesivo de calorías, adicionado a un estilo de vida sedentario, pero estos no son los únicos factores que pueden desencadenarla. Si bien, es un hecho que la obesidad puede ser una enfermedad genética heredada, es destacable la contribución de las “marcas epigenéticas” que adquirimos durante la gestación (heredada de los padres), y que se pueden modificar a lo largo del embarazo por las condiciones ambientales y nutricionales con los que la madre está en contacto. Estas marcas epigenéticas consisten en la adición de grupos químicos tanto en el DNA como en las proteínas asociadas al DNA que si bien, no modifican directamente la secuencia del DNA, si modifican la expresión (función) de los genes, es decir, “enciende” o “apaga” los genes cambiando las funciones del organismo. Los cambios epigenéticos que se generan durante el embarazo pueden influir en el desarrollo de la obesidad y de enfermedades crónicas en la vida adulta como diabetes, hipertensión, dislipidemia, aterosclerosis, entre otras.

Palabras clave: programación fetal, obesidad, epigenética

¿Cuántas veces hemos oído que cuando una mujer está embarazada debe “comer por dos”? O que, a pesar de que la madre consume cualquier cantidad de comida o tipo de alimento, “el bebé sólo tomará aquello que requiere”. También se sugiere que “ninguna comida es mala durante el embarazo”, o por el lado contrario, se dice “que se deben eliminar de tajo ciertos alimentos ricos en grasas, sal o comida picante, etc.” y que “el sobrepeso en una mujer al embarazarse no afectará la salud del bebé”. Los mitos y las creencias al respecto son diversos y la realidad es que a pesar de que tenemos muchas fuentes de información a nuestro alcance, muchas veces nos limitamos a creer lo que nuestras madres o abuelas creían, o consideramos como cierto todo aquello que leemos en redes sociales y que parezca “información científica” sin asegurarnos que provenga de una fuente confiable.

Lo cierto es que, el estado nutricional de la mujer al momento del embarazo y la alimentación que decida llevar durante este proceso “afecta al bebé” y puede ser un determinante para la predisposición del bebé a la obesidad y al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles en su vida adulta. Hablemos un poco al respecto...

Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad son un problema de salud a nivel mundial. Diversas fuentes, entre ellas la OMS, indican que este problema es un importante factor de riesgo para enfermedades crónicas no transmisibles como: hipertensión arterial, diabetes, dislipidemias y algunos cánceres como el de ovario, mama, próstata, hígado, entre otros. En el 2018 la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) informó que en México: el 8.2% de la población de 0 a 4 años padece sobrepeso, el 35.6% de la población de 5 a 11 años padece obesidad y sobrepeso, el 38.4% de la

población de 12 a 19 años padece obesidad y sobrepeso y la población mayor a 20 años presenta 75.2% de sobrepeso (39.1%) y obesidad (36.1%).

La obesidad siempre ha estado asociada al consumo excesivo de calorías adicionado a un estilo de vida sedentario, pero el incremento de las estadísticas de obesidad y el sobrepeso a nivel mundial no es sólo atribuible a tales condiciones, por lo que se hace necesaria la búsqueda de información e investigación que nos proporcione respuestas sobre el aumento desmedido en este problema.

¿La obesidad está codificada en nuestros genes?

¿Cuántas veces hemos escuchado que si nuestros padres sufren de obesidad, entonces nosotros somos susceptibles también de padecerla? Si bien, es un hecho que la obesidad puede ser una condición genética heredada, este no es el único factor desencadenante para esta condición, ya que existen otros factores entre los que podemos destacar las “marcas epigenéticas” que se adquieren durante la gestación (heredada de nuestros padres), y que se pueden

modificar a lo largo del embarazo por las condiciones ambientales y nutricionales con los que la madre está en contacto. Estas marcas epigenéticas consisten en la adición de grupos químicos tanto en el DNA como en las proteínas asociadas al DNA que si bien, no modifican directamente la secuencia del DNA, si modifican la expresión (función) de los genes, es decir, “enciende” o “apaga” los genes. Los cambios epigenéticos que se generan durante el embarazo pueden influir en el desarrollo de la obesidad (Figura 1) y de enfermedades crónicas en la vida adulta como la diabetes, la hipertensión, dislipidemias, aterosclerosis, entre otras (Milagro y Martínez, 2013; Mouzaki y Ling, 2017).

Programación metabólica fetal

En la década de los 80, David James Porslove Barker un médico y epidemiólogo inglés propuso la: “hipótesis de Barker”, “programación fetal” o posteriormente llamada “programación metabólica fetal” que postula que la nutrición de la madre en el embarazo y algunos factores ambientales adversos durante el desarrollo embrionario y fetal (período crítico para

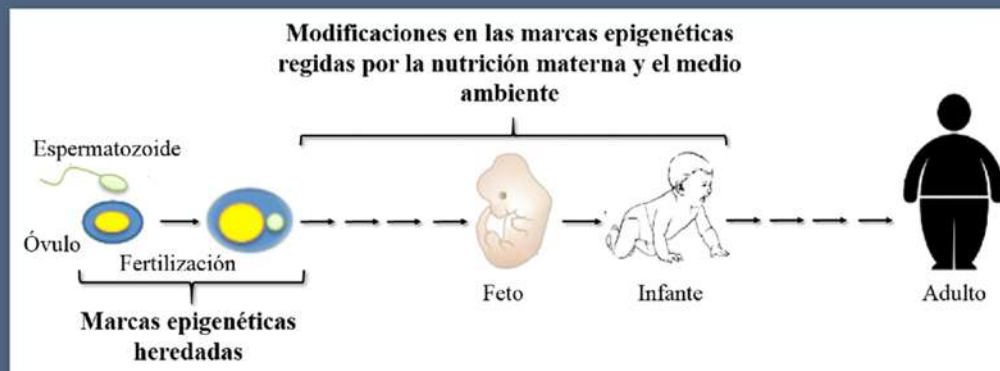


Figura 1. Los cambios en las "marcas epigenéticas" regulados por la nutrición materna y el medio ambiente pueden influir en la tendencia a la obesidad en la vida adulta. Modificado de: Li Y, 2018.

el desarrollo de órganos y tejidos) puede generar cambios estructurales, metabólicos y fisiológicos permanentes en el individuo que lo hará susceptible a padecer ciertas enfermedades crónicas durante su vida adulta, entre ellas, obesidad, hipertensión arterial, dislipidemias, entre otras. (Barrera Reyesa y FernándezCarrocerab, 2015; RamírezVéleza, 2015; Zhu *et al.*, 2019). La "hipótesis de Barker" ha migrado hacia la teoría "Orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad del adulto" o "DoHaD (por sus siglas en inglés, Developmental Origins of Health and adult Disease) que postula que el entorno de la vida temprana en periodos críticos de desarrollo y el crecimiento influyen en la salud posterior del individuo a corto y largo plazo. (Mandy y Nyirenda, 2018)

La relación entre el desarrollo de la obesidad en los primeros años de vida, la nutrición materna durante el embarazo y las modificaciones epigenéticas se ha demostrado en humanos por un grupo de investigadores en la Universidad de Southampton, en Reino Unido, mediante el análisis del DNA del cordón umbilical de recién nacidos sanos y otros que posteriormente son propensos a la obesidad (Lillicrop *et al.*, 2019).

Tanto la falta como el exceso en los componentes de la dieta materna pueden ser determinantes para ocasionar cambios en el organismo del infante. El consumo excesivo de alimentos con alto contenido de grasa por parte de la

embarazada juega un papel fundamental en la tendencia de los niños al sobrepeso y la obesidad en edades tempranas. Además, el desequilibrio en los ácidos grasos que recibe el infante durante el embarazo contribuye a la aparición de enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión y dislipidemia durante la etapa adulta (Milagro y Martínez, 2013; Zhu Z. *et al.*, 2019). Por otro lado, una nutrición deficiente o la disminución en la capacidad de absorción de nutrientes de las madres embarazadas, puede provocar defectos persistentes, como la reducción en el número de células en los tejidos, la modificación estructural de los órganos, la selección de ciertos tipos celulares que formarán parte de órganos y tejidos, así como modificaciones en la producción de hormonas clave para el desarrollo y función del organismo del infante que se verá reflejado finalmente en una reducción y retraso de su crecimiento (Kwony & Kim, 2017). Además, se demostró durante la hambruna de Holanda en los años 40 del siglo pasado, que la desnutrición intrauterina puede causar obesidad en los descendientes durante la vida adulta. Existen también reportes de la asociación entre el bajo peso y la talla al nacer, con el aumento en el riesgo de sufrir posteriormente enfermedades como hipertensión arterial (HTA) y síndrome metabólico (en la que está incluida la obesidad). Por lo tanto, la falta o el exceso de componentes en la dieta materna durante el desarrollo del infante pueden generar marcas

epigenéticas que lo predispongan a tener más posibilidades de ser obeso o padecer enfermedades crónicas no transmisibles (RamírezVéleza, 2015; Zhu *et al.*, 2019).

Es importante destacar que hay estudios que comprueban que una dieta balanceada durante el embarazo y/o la lactancia materna puede jugar un papel benéfico en la "programación fetal", y con ello se puede poner freno al desarrollo de enfermedades crónicas durante la vida adulta, entre ellas el alarmante aumento de obesidad a nivel mundial.

Alimentación durante el embarazo

El estado nutricional de la mujer en el momento del embarazo y la alimentación que lleve durante este proceso, pueden ser determinantes en la salud del infante, así que una alimentación balanceada y bien dirigida, pueden resultar en el beneficio no sólo del niño sino también en la salud de la madre. En la Tabla 1 se muestra un comparativo de algunos requerimientos de energía y nutrientes de una mujer adulta embarazada y una que no lo está, publicados por el Departamento de Nutrición y Bioprogramación del Instituto Nacional de Perinatología «Isidro Espinosa de los Reyes», Ciudad de México (FloresQuijano y HellerRouassant, 2016).

Adicionalmente, aquí se exponen algunas consideraciones generales sobre una dieta adecuada: ingerir todos los grupos alimenticios (frutas, verduras, cereales, leguminosas y alimentos de

origen animal) en cantidades suficientes y equilibradas, evitar en la medida de lo posible los “antojos desmedidos” y la comida “chatarra”, tomar agua durante el día, evitar el consumo de alimentos crudos o poco cocinados, evitar el consumo de azúcares refinados, de bebidas azucaradas, evitar el consumo de alcohol, tabaco y fármacos que no hayan sido prescritos por un médico (Sánchez Muñiz *et al.*, 2013). Lo ideal es que las recomendaciones nutrimentales sean individualizadas y provengan de un nutriólogo o de un médico experto en nutrición que pueda orientar de manera adecuada los requerimientos específicos de acuerdo al estado nutricional de la mujer embarazada.

La nutrición en el embarazo no debe sólo verse desde el punto de vista de aporte de “comida saludable”, es importante poder asegurar que los nutrientes que lleguen al infante permitan la interacción con los genes y por tanto, una respuesta positiva hacia la “programación fetal”. Mantener hábitos alimenticios adecuados y un estilo de vida saludable permitirá que la interacción entre la madre gestante y el feto sea favorable para la salud futura del infante, disminuye el riesgo de que el infante sea obeso y que padezca de enfermedades crónicas durante su vida adulta como hipertensión arterial, dislipidemias, diabetes, entre otras. Por otro lado, la madre disminuye el riesgo de retención de líquidos, diabetes gestacional, obesidad, preeclampsia y anemia que pongan en riesgo su vida y/o la del feto.

La evaluación del estado nutricional de la mujer embarazada y la educación alimentaria deberían ser prácticas rutinarias incorporadas a la consulta obstétrica. Si bien, el sistema de salud mexicano hace campañas que animan a la mujer embarazada a mantener hábitos saludables, entre ellos el de ingerir comida saludable (IMSS, Alimentación durante el embarazo), aún se carece de una evaluación del estado nutricional y un seguimiento de las embarazadas en este sentido. Por lo tanto, uno de los principales retos para el sector salud, no solo para las mujeres embarazadas si no en general para toda la población, es el concientizar y educar sobre los beneficios de llevar una nutrición equilibrada y un estilo de vida saludable. Por otra parte, dentro del campo de la investigación representa todo un reto determinar y caracterizar cuáles son las “marcas epigenéticas” que predisponen al feto a desarrollar obesidad u otros padecimientos con el propósito de poder encontrar mecanismos para modificarlas.

Bibliografía

•BarreraReyes R. y FernándezCarrocerab LA. (2015) Programación metabólica fetal. Perinatología y Reproducción Humana. 29 (3):99105. DOI: 10.1016/j.rprh.2015.12.003. URL:
 •Danielewicz H., Myszczyzyn G., Debińska A., Myszał A., Boznański A. y Himle L. (2017) European Journal of Pediatrics. 176(12): 1573–1579. DOI: . URL:

•Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT). Presentación de resultados. URL:
 •FloresQuijano y HellerRouassant (2016) Embarazo y lactancia. Gaceta Médica de México. 152 Suppl 1:612. URL:
 •Guía dietaria para americanos: Dietary Guidelines for Americans 20152020. Octava edición.
 •IMSS. Alimentación durante el embarazo. URL:
 •Kwon E.J., Kim Y.J. (2017) What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci*.60(6):506519. DOI: 10.5468/ogs.2017.60.6.506. URL:
 •Lillicrop K.A., Garratt E.S., Titcombe P., Melton P.E., Murray R.J.S., Barton S.J., ClarkeHarris R., Costello P.M., Holbrook J.D., Hopkins J.C., Childs C.E., Paras Chavez C., Calder P.C., Mori T.A., Bellin L, Burdge G.C., Gluckman P.D., Inskip H.M., Harvey N.C., Hanson M.A., Huang R.C., Cooper C., EpiGen Consortium y Godfrey K.M. (2019) Differential SLC6A4 methylation: a predictive epigenetic marker of adiposity from birth to adulthood. *International Journal of Obesity*. 43(5): 974–988. doi: 10.1038/s4136601802543. URL:
 •Mandy M. y Nyirenda M. (2018) Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *International Health*.10(2):66–70. DOI: 10.1093/inthealth/ihy006 URL:
 •Milagro F.I. y Martínez J.A. (2013) Epigenética en obesidad y diabetes tipo 2: papel de la nutrición, limitaciones y futuras aplicaciones. *Rev. endocrinol. Diabetes*. 6 (3): 108114. URL:
 •Mouzaki M. y Ling S. (2017) The Highs and Lows of Fetal Programming for Fatty Liver Disease. *The Journal of Pediatrics*. 187: 1315. URL:
 •Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018) Obesidad y Sobrepeso. .
 •RamírezVélez R. (2015) Programación Fetal *in utero* y su impacto en la salud del adulto. *Endocrinología Nutrición* 59(6):383393. DOI: 10.1016/j.endonu.2012.02.002. URL:
 •SánchezMuñiz, Gestelro E., EspárragoRodilla M., RodríguezBernal B. y Bastida S. (2013) La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Nutrición Hospitalaria*. 28(2):250274. URL:
 •Zhu Z., Cao F., Li X. (2019) Epigenetic Programming and Fetal Metabolic Programming. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 10: 764. DOI: 10.3389/fendo.2019.00764. URL:

Tabla 1. Requerimientos de energía y nutrientes durante el embarazo

Requerimientos	Mujer adulta	Mujer embarazada
Energía	2400 – 2600 Kcal/día	2740 - 2960 Kcal/día
Proteína	46 g	10 - 25 g
Lípidos	20 -25% del aporte energético	20 -25% del aporte energético
Carbohidratos	130 g	175 g
Calcio	1000 – 1300 mg	1000 – 1300 mg
Vitamina D	200 UI	200 UI
Fósforo	700 mg	700 mg
Vitamina B 12	2.4 µg	2.6 µg

*Kcal: kilocalorías, g: gramos, mg: miligramos, µg: microgramos.

Tomado de: FloresQuijano y HellerRouassant, 2016; Guía dietaria alimentaria para Americanos, 20152020.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Es bien reconocido que los péptidos antimicrobianos pueden fungir como agentes anticancerosos. Existen diversos reportes de actividades anticancerosas en péptidos antimicrobianos e incluso existen algunos de ellos que ya se encuentran en ensayos clínicos como potenciales agentes anticancerosos (ejemplo: LL-37 en fase II, para melanoma) (Tornesello *et al.*, 2020). En este trabajo, se evaluaron las modificaciones epigenéticas de la histona 3 en dos líneas celulares de leucemias, inducidas por dos defensinas de plantas con potencial como agentes anticancerosos.

En un trabajo anterior, se reportó que la defensina PaDef es citotóxica en la línea de leucemia mieloide crónica K-562, a través de un proceso de tipo apoptótico activado por la vía extrínseca (Flores-Álvarez *et al.*, 2018). En este trabajo se utilizó una línea de leucemia de origen diferente, la línea de leucemia linfocítica aguda Jurkat, en el que se demostró que PaDef también tiene un efecto citotóxico. El efecto de PaDef fue dependiente de la concentración, con una $IC_{50} = 47.3 \mu M$, a través de la activación de un mecanismo de tipo apoptótico. Esto es deseable en un candidato a tratamiento, debido a que se evita la inflamación producida por mecanismos de muerte como la lisis celular (necrosis) (Adeyinka & Bashir, 2022). La inducción de la apoptosis fue iniciada a través de la activación de caspasas 8 y 9, que activan las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis, correspondientemente.

Consecuentemente con la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, se determinó que el tratamiento con PaDef indujo la producción de ROS y la pérdida en el potencial de membrana mitocondrial. Además, el análisis de la expresión génica de la familia Bcl-2 arrojó que el tratamiento con PaDef disminuye significativamente la expresión de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2: Bcl-2 y Bcl-w, pero se sobreexpresan los genes proapoptóticos Bax y Bik. Mientras que la disminución del gen Bcl-2 no se refleja a nivel de proteína, el incremento en la expresión de Bax y Bik puede resultar de interés, debido a que existe un reporte que respalda la capacidad de Bik para activar la muerte apoptótica independiente de caspasas a través de Bax (Oppermann *et al.*, 2005). Este dato es relevante, debido a que el bloqueo de la activación de caspasas no inhibió el efecto citotóxico de PaDef,

por lo que se propone que se pueden activar mecanismos alternos para la inducción de la apoptosis, y esto podría estar relacionado con la sobreexpresión de Bik. Sin embargo, es necesario verificar si la sobreexpresión de estos genes se refleja también a nivel de proteína. El hecho de que una molécula pueda desencadenar la muerte celular a través de varias vías, puede representar una ventaja importante frente a la resistencia al tratamiento, ya que la resistencia a la muerte celular es uno de los sellos distintivos de las células cancerosas, y en las leucemias, la resistencia a la quimioterapia es algo frecuente. La apoptosis puede ser evadida en las células cancerosas a través de diversas proteínas, por ejemplo, la sobreexpresión de componentes antiapoptóticos o la subexpresión de componentes proapoptóticos (Pfeffer & Singh, 2018). La restauración de la apoptosis en las células cancerosas es un blanco deseable para las moléculas anticancerosas, esto permite la eliminación de las células cancerosas que perdieron la capacidad de desencadenar la apoptosis ante la pérdida de la homeostasis entre la proliferación celular y la tasa de muerte celular (Chung, 2018) (Capítulo 1).

Por otra parte, también se determinó la IC_{50} para la defensina γ -tionina en las líneas celulares K-562 y Jurkat (Capítulo 2). La IC_{50} calculada para γ -tionina en la línea celular Jurkat fue 47 μ M y para K-562 fue 50.3 μ M. En ambos casos la actividad de γ -tionina fue dependiente de la concentración. Los rangos encontrados en las IC_{50} de ambos péptidos coinciden con los reportes de citotoxicidad de otros péptidos, FK-16 (40 μ M), que es un péptido derivado de la catelicidina humana LL-37, este fue probado en células de cáncer de colon HCT116 (Ren *et al.*, 2013), un péptido de semillas de frijol escarlata, faseococcina (40.5 μ M) en células de leucemia HL60 (Ngai & Ng, 2005) y gimnina (50 μ M), un péptido proveniente de semillas de frijol, probado en una línea de leucemia murina M1 (Wong & Ng, 2003). Estas determinaciones, permitieron utilizar las concentraciones a las que las defensinas son citotóxicas, tanto en las células Jurkat como en la línea celular K-562, para determinar si tenían un efecto de tipo epigenético asociado a su actividad citotóxica.

En cuanto al análisis epigenético, tanto PaDef (capítulo 1) como γ -tionina (capítulo 2), inducen cambios en las marcas de acetilación (global y específica de la lisina 9) y metilación en la histona 3 (dimetilación y trimetilación de la lisina 9), con una regulación a la alza. El

incremento en la marcas de acetilación para el tratamiento con PaDef en la línea celular Jurkat está correlacionado con la inhibición de la actividad de las HDACs de clase I (HDAC I, 2, 3 y 8). Esto podría indicar que PaDef es un inhibidor de HDACs (iHDAC) en la línea celular Jurkat (Capítulo 1). Para el caso de γ -tionina, es necesario analizar la actividad de las HDACs para corroborar que el incremento en las marcas de acetilación también están asociadas a la inhibición de HDACs. Hasta el momento, de los iHDACs existentes (aprobados por la FDA y en ensayos clínicos), existen algunos inespecíficos y otros más, creados más recientemente, dirigidos a HDACs específicas. La especificidad en los iHDACs ayuda a disminuir los efectos tóxicos hacia las células sanas; sin embargo, no los desaparece por completo (Eckschlager *et al.*, 2017). En el caso de PaDef, nuestros reportes indican que ejerce su actividad en células cancerosas sin dañar células sanas (Flores-Álvarez *et al.*, 2018), esto podría representar una ventaja frente a los iHDACs existentes, ya que podrían reducir los efectos tóxicos asociados con el péptido.

Además, se realizó un análisis *in silico* para determinar la viabilidad de la unión directa entre PaDef y las HDACs de clase I, el resultado mostró energías libres de afinidad (ΔG) más favorables que algunos de los iHDACs ya reportados (TSA, SAHA y NaB), y aparentemente, la unión no depende del sitio catalítico de la enzima. Esto podría representar otra ventaja del uso de PaDef como un iHDACs ya que algunos de los principales iHDACs son moléculas pequeñas que bloquean la actividad enzimática a través el sitio catalítico de la enzima (se unen a una molécula de Zn^{2+} dentro del sitio catalítico); sin embargo, existen varias proteínas que cuentan con estos mismos sitios de unión que son blanco de estos mismos inhibidores, por tal motivo el efecto sigue siendo inespecífico y se presentan efectos secundarios asociados (Ganesan *et al.*, 2019). Sin embargo, resulta necesario corroborar que efectivamente existe una unión directa entre PaDef y HDAC.

Por su parte, el incremento en las marcas de metilación (dimetilación y trimetilación de la lisina 9), tanto para γ -tionina (capítulo 2) como para PaDef (capítulo 1), podría estar relacionado a la iHDACs, pues se sabe que los tratamientos con iHDACs pueden tener un impacto en el estado de metilación de histonas (véase discusión del capítulo I). No obstante,

las marcas que se han encontrado modificadas son diversas, lo que sugiere que no existe un patrón específico de cambio.

La reversibilidad de las alteraciones epigenéticas ha propiciado un gran interés en la búsqueda de moléculas con actividad epigenética en células cancerosas (Feng & De Carvalho, 2022). Los principales candidatos objetivos en la búsqueda de fármacos epigenéticos son las enzimas epigenéticas (lectores, escritores y borradores) (Feng & De Carvalho, 2022). Pero hasta el momento, aún no se comprende del todo los efectos de los fármacos epigenéticos existentes, por lo que el entendimiento de los mecanismos epigenéticos que pueden tener las moléculas con actividad epigenética orientará de mejor manera los tratamientos contra el cáncer.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

Las defensinas de plantas γ -tionina y PaDef incrementan marcas de acetilación y metilación en la histona 3, en células de leucemia mieloide crónica y linfocítica aguda. Además, PaDef inhibe la actividad de las HDACs de clase I. Estas modificaciones se observan al tratar las líneas celulares de leucemia con las IC_{50} de las defensinas, por lo que la modulación epigenética podría estar relacionada con el efecto citotóxico de las defensinas. La evidencia sugiere que estas moléculas podrían ser candidatos prometedores en la búsqueda de terapia epigenética que ayude en el tratamiento para las leucemias. Sin embargo, el conocimiento a profundidad de los mecanismos moleculares involucrados en el efecto de estas defensinas resulta necesario e ideal, dado que los fármacos epigenéticos aprobados hasta el momento en la terapia contra las leucemias, carecen del conocimiento suficiente como para entender los efectos a largo alcance. A pesar de lo anterior, los fármacos epigenéticos muestran resultados prometedores en diversos tipos de pacientes con leucemia, por lo que siguen resultando ser una alternativa atractiva.

10.REFERENCIAS

- Adeyinka A., Bashir K. **Síndrome de lisis tumoral**. [Actualizado el 15 de mayo de 2022].
En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2022 ene-.
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518985/>
- Ahmad, A. (2020). **CAR-T cell therapy**. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4303. <https://doi.org/10.3390/ijms21124303>
- Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D., Caparro M.L. (2007) **Epigenetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.
- American Cancer Society (24 mayo 2022). **Quimioterapia**.
<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia.html>
- Antimicrobial peptide database APD3 (28 mayo 2022). **Antimicrobial Peptide Database**.
<https://aps.unmc.edu/>
- Arana T. R. M., del Castillo M. A., Alcalá C. L. G., Madrid C. V., Kassack I. J. J., Gutiérrez R. M., ... Cuevas C. S. A. (2017). **Chromosomal abnormalities in patients with haematologic malignancies in the General Hospital of Mexico**. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 80(2), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.11.006>
- Arceo-Martínez, M. T., Guzmán-Rodríguez, J., Palomera-Sánchez, Z., Ochoazarzosa, A., and López-Meza, J. E. “**Defensin γ -thionin from capsicum chinense induce apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7 and regulate histone H3 epigenetic modifications,**” in proceedings of the ASBMB Conference presentation convention Experimental Biology (EB), San Diego, CA, United States, April 2018.
- Asano T. (2020). **Drug resistance in cancer therapy and the role of epigenetics**. *Journal of Nippon Medical School*, 87(5), 244–251.
https://doi.org/10.1272/jnms.JNMS.2020_87-508

-
- Baeker-Bispo, J.A., Pinheiro P.S., & Kobetz E.K. (2020). **Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(6), a034819. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819>
- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T, Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R., & Sultan C. (1976). **Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group**. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
- Biswas S., Rao C.M. (2018) **Epigenetic tools (The writers, the readers and the erasers) and their implications in cancer therapy**. *Eur Journal Pharmacol.* 837:8-24. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.021. Epub 2018 Aug 18. PMID: 30125562.
- Brunvand M.W. & Carson J. (2018). **Complete remission with romidepsin in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia refractory to induction hyper-CVAD**. *Hematological Oncology*, 36(1), 340–343. <https://doi.org/10.1002/hon.2421>
- Burke M.J., Kostadinov R., Sposto R., Gore L., Kelley S., Rabik C., ... & Brown, P. (2020). **Decitabine and Vorinostat with chemotherapy in relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia: a TACL pilot study**. *Clinical Cancer Research*, 26(10), 2297–2307. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1251>.
- Camilio K.A. (2013) **Short Lytic Anticancer Peptides as a Novel Therapy against Cancer**. [Tesis de doctorado, University of Thromsø] Archivo de investigación abierto de la Universidad de Noruega. <https://munin.uit.no/handle/10037/5489>
- Carbone A. (2020). **Cancer classification at the crossroads**. *Cancers*, 12(4), 10–15. <https://doi.org/10.3390/cancers12040980>
- Cernan M., Sztokowski T., & Pikalova Z. (2017). **Mixed-phenotype acute leukemia: State-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment**. *Biomedical Papers*, 161(3), 234–241. <https://doi.org/10.5507/bp.2017.013>
- Chen J., Odenike, O., & Rowley J.D. (2010). **Leukemogenesis: More than Mutant Genes**. *Nat Rev Cancer*, 78(2), 711–716. <https://doi.org/10.1038/nrc2765>.Leukemogenesis

-
- Chmurska A., Matczak K., & Marczak A. (2021). **Two faces of autophagy in the struggle against cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms22062981>
- Chung C. (2018) **Restoring the switch for cancer cell death: Targeting the apoptosis signaling pathway.** *Am Journal Health Syst Pharm.* 75(13):945-952. doi: 10.2146/ajhp170607.
- Clapier C.R., Iwasa J., Cairns B.R. & Peterson C.L. (2017). **Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes.** *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(7), 407–422. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>
- Claudiani S., & Apperle, J.F. (2018). **The argument for using imatinib in CML.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, (1), 161–167. <https://doi.org/10.1182/educación-2018.1.161>
- Corces-Zimmerman M., & Ravindra M. (2014). **Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells - the importance of early mutations in leukemogenesis.** *Leukemia*, 61(6), 515–525. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.211>.Pre-leukemic
- Corces M.R., Chang H.Y., & Majeti R. (2017). **Preleukemic hematopoietic stem cells in human acute myeloid leukemia.** *Frontiers in Oncology*, 7(NOV), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00263>
- DiGiuseppe J.A., & Wood B.L. (2019). **Applications of flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and posttreatment monitoring of B and T lymphoblastic leukemia/lymphoma.** *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 96(4), 256–265. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21833>
- Doubova S.V., Terreros-Muñoz E., Delgado-López N., Montaña-Figueroa E.H., Infante-Castañeda C., & Pérez-Cuevas R. (2020). **Experiences with health care and health-related quality of life of patients with hematologic malignancies in Mexico.** *BMC Health Services Research*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12913-020-05498-7>
- Du M., Chen W., Liu K., Wang L., Hu Y., Mao Y., ... Ye D. (2022). **The global burden of leukemia and its attributable factors in 204 countries and territories: findings from the global burden of disease 2019 Study and Projections to 2030.** *Journal of*

Oncology, 2022, 14. <https://doi.org/10.1155/2022/1612702>

- Dupont C., Armant D.R., & Brenner C.A. (2009). **Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective**. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(5), 351–357. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>
- Eckschlager T., Plch J., Stiborova M., & Hrabeta J. (2017). **Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs**. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
- El Shazely B., Yu G., Johnston P.R., & Rolff J. (2020). **Resistance evolution against antimicrobial peptides in staphylococcus aureus alters pharmacodynamics beyond the MIC**. *Frontiers in Microbiology*, 11(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00103>
- Elmore S. (2007). **Apoptosis: A review of programmed cell death**. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Falkenberg K.J., & Johnstone R.W. (2014). **Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders**. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 673–691. <https://doi.org/10.1038/nrd4360>
- Feng S., & De Carvalho D.D. (2022). **Clinical advances in targeting epigenetics for cancer therapy**. *FEBS Journal*, 289(5), 1214–1239. <https://doi.org/10.1111/febs.15750>
- Flores-Alvarez, L.J., Guzmán-Rodríguez J.J., López-Gómez R., Salgado-Garciglia R., Ochoa-Zarzosa A., & López-Meza J.E. (2018). **PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var . *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis**. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 99, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.013>
- Flores-Álvarez L.J. (2018) **Mecanismos de citotoxicidad de péptidos antimicrobianos de origen vegetal contra la línea celular de leucemia mieloide crónica K-562**. [Tesis doctoral, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio UMSNH <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/>
- Gambacorta V., Gnani D., Vago L., & Di Micco R. (2019). **Epigenetic therapies for acute**

-
- myeloid leukemia and their immune-related effects.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00207>
- Ganesan A., Arimondo P.B., Rots M.G, Jeronimo C., & Berdasco M. (2019). **The timeline of epigenetic drug discovery: From reality to dreams.** *Clinical Epigenetics*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0776-0>
- Graham T. A., & Sottoriva A. (2017). **Measuring cancer evolution from the genome.** *Journal of Pathology*, 241(2), 183–191. <https://doi.org/10.1002/path.4821>
- Greim H., Kaden D.A., Larson R.A., Palermo C.M., Rice J.M., Ross D., & Snyder R. (2014). **The bone marrow niche, stem cells, and leukemia: Impact of drugs, chemicals, and the environment.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1310(1), 7–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12362>
- Guzmán-Rodríguez J.J., López-Gómez R., Salgado-Garciglia R., Ochoa-Zarzosa A., & López-Meza J.E. (2016). **The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7.** *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 82, 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>
- Guzmán-Rodríguez J.J., López-Gómez R., Suárez-Rodríguez L.M., Salgado-Garciglia R., Rodríguez-Zapata L.C., Ochoa-Zarzosa A., & López-Meza J.E. (2013). **Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/986273>
- Guzmán-Rodríguez J.J., Ochoa-Zarzosa A., López-Gómez R., & López-Meza J. E. (2015). **Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents.** *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/735087>
- Guzmán-Rodríguez J.J. (2016) **Citotoxicidad de las defensinas PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) y γ -tionina (*Capsicum chinense*) contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7** [Tesis doctoral, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio UMSNH <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/>
- Hafeez A.B., Jiang X., Bergen P.J., & Zhu Y. (2021). **Antimicrobial peptides: An update**

- on classifications and databases.** *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21).
<https://doi.org/10.3390/ijms222111691>
- Hanahan D. (2022). **Hallmarks of cancer: new dimensions.** *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan D., & Weinberg R.A. (2011). **Hallmarks of cancer: The next generation.** *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hoffbrand A.V., Higgs D.R., Keeling D.M., & Mehta A.B. (2016). **WHO classification: tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues**, 885–887. <https://doi.org/10.1002/9781118853771.ch51>
- Instituto Nacional de Cáncer (NIH) (23 mayo 2022). **Definición de Quimioterapia.** <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/quimioterapia>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI (2021). **Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero).** Comunicado de prensa núm. 105/21. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- Imrie K., Dicke K.A., & Keating A. (1996). **Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia.** *Stem Cells*, 14(1), 69–78. <https://doi.org/10.1002/stem.140069>
- Ishaq N., Bilal M., & Iqbal H. (2019). **Medicinal Potentialities of plant defensins: a review with applied perspectives.** *Medicines*, 6(1), 29. <https://doi.org/10.3390/medicines6010029>
- Kadia T.M., Ravandi F., Cortes J., & Kantarjian H. (2016). **New drugs in acute myeloid leukemia.** *Annals of Oncology*, 27(5), 770–778. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw015>
- Karol S.E., Cooper T.M., Mead P.E., Crews K.R., Panetta J.C., Alexander T.B., ... Rubnitz J.E. (2020). **Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of panobinostat in children, adolescents, and young adults with relapsed acute myeloid leukemia.**

-
- Cancer*, 126(21), 4800–4805. <https://doi.org/10.1002/cncr.33156>.
- Kato M., & Manabe A. (2018). **Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Pediatrics International*, 60(1), 4–12. <https://doi.org/10.1111/ped.13457>
- Kayser S., & Levis M.J. (2028). **Advances in targeted therapy for acute myeloid leukemia.** *Br. J. Hematology*, 8(1), 484–500. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00196-2>
- Klco J.M., & Mullighan C.G. (2021). **Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms.** *Nature Reviews Cancer* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00315-z>
- Kovaleva V., Bukhteeva I., Kit O.Y., & Nesmelova I.V. (2020). **Plant defensins from a structural perspective.** *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21155307>
- Ladines-Castro W., Barragán-Ibañez G., Luna-Pérez M.A., Santoyo-Sánchez A., Collazo-Jaloma J., Mendoza-García E., & Ramos-Peñafiel C.O. (2016). **Morphology of leukaemias.** *Revista Médica Del Hospital General de México*, 79(2), 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.007>
- Lavaut S.K. (2020). **Citogenética de las hemopatías malignas en la era de la secuenciación.** *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. Hemoter*, 36(3), e1243–e1243. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892020000300010
- Lay F., & Anderson M. (2005). **Defensins-components of the innate immune system in Plants.** *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 85–101. <https://doi.org/10.2174/1389203053027575>
- Lemchak D.M., & Akilov O.E. (2016). **Romidepsin controls chronic lymphocytic leukemia in a patient with mycosis fungoides.** *Hematology Reports*, 8(4), 54–55. <https://doi.org/10.4081/hr.2016.6840>
- Lin P., Wong J.H., Ng T.B. (2009) **A defensin with highly potent antipathogenic activities from the seeds of purple pole bean.** *Biosci Rep.* 30(2):101-9. doi: 10.1042/BSR20090004. PMID: 19335335.

- Liu S., Klisovic R.B., Vukosavljevic T., Yu J., Paschka P., Huynh L., Pang J., Neviani P., Liu Z., Blum W., Chan K.K., Perrotti D., Marcucci G. (2007) **Targeting AML1/ETO-histone deacetylase repressor complex: a novel mechanism for valproic acid-mediated gene expression and cellular differentiation in AML1/ETO-positive acute myeloid leukemia cells.** *Journal Pharmacol Exp Ther.* 321(3):953-60. doi: 10.1124/jpet.106.118406. Epub 2007 Mar 26. PMID: 17389244.
- Liu X., Liu H., Li J., Mao C., He J., & Zhao X. (2020). **Role of epigenetic in leukemia: From mechanism to therapy.** *Chemico-Biological Interactions*, 317. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108963>
- Madera L., & Hoskin D.W. (2016). **Protocols for Studying Antimicrobial Peptides (AMPs) as anticancer agents.** *Antimicrobial peptides* 1548: 331–343. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7>
- McKenzie S.B.; Tr. Méridgo-Jane J.A., Cervera-Ceballos E. (2000) **Aspectos generales y Clasificación de la Leucemia.** *Hematología Clínica.* México. Editorial el Manual Moderno
- Minciacchi V.R., Kumar R., & Krause D.S. (2021). **Chronic myeloid leukemia: a model disease of the past, present and future.** *Cells*, 10(1), 117. <https://doi.org/10.3390/cells10010117>
- Miranda-Furtado C.L., Dos Santos-Luciano, M.C., Silva-Santos R. Da-Furtado G.P., Moraes M.O., & Pessoa C. (2019). **Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment.** *Epigenetics*, 14(12), 1164–1176. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>
- Morabito F., Tripepi G., Del Poeta J., Mauro F.R., Reda G., Sportoletti P., Laurenti L., Coscia M., Herishanu Y., Bossio S., Varettoni M., Muru R., Chiarenza A., Visentin A., Condolucía A., Moia R., Pietrasanta D., Loseto G., Consolali U., ... Gentil M. (2021) **Comparison of ibrutinib and idelalisib plus rituximab in real-life relapsed/resistant chronic lymphocytic leukemia cases.** *Eur. J. Haematol.* 106(4):493-499. <https://doi.org/10.1111/ejh.13573>

-
- National Human Genome Research Institute (NHGRI) (2022). **Chromosomal Mutations**.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview/mutation_chromosome.html
- Navarrete-Meneses M., & Pérez-Vera P. (2017). **Alteraciones epigenéticas en leucemia linfoblástica aguda**. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 74(4), 243–264.
<https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2017.02.005>
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., & Goździcka-Józefiak A. (2014). **Plant antimicrobial peptides**. *Folia Microbiologica*, 59(3), 181–196.
<https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>
- Nepali K., & Liou J. P. (2021). **Recent developments in epigenetic cancer therapeutics: clinical advancement and emerging trends**. *Journal of Biomedical Science* (Vol. 28). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00721-x>
- Ngai P.H.K, and Ng T.B.. (2005). **“Phaseococcin, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans”** *Biochem Cell Biol.*, 83(2):212-20. doi: 10.1139/o05-037
- Ohnishi H., Taki T., Yoshino H., Takita J., Ida K., Ishii M., Nishida K., Hayashi Y., Taniwaki M., Bessho F., & Watanabe (2008) T. **A complex t(1;22;11)(q44;q13;q23) translocation causing MLL-p300 fusion gene in therapy-related acute myeloid leukemia**. *Eur J Haematol.*81(6):475-80. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01154.x. Epub 2008 Sep 6. PMID: 18778367
- Olsen M. (2016). **Overview of hematologic malignancies lymphomas**. *Canadian Oncology Nursing Journal*, 26(2), 1–17.
- Opendbosch N. Van & Lamkanfi M. (2019). **Caspases in cell death, inflammation and disease**. *Immunity*, 50(6), 1352–1364.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>.Caspases
- Oppermann M., Geilen C.C., Fecker L.F., Gillissen B., Daniel P.T., & Eberle J. (2005). **Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk/Bik**. *Oncogene*, 24(49), 7369–7380.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208890>

-
- Parsons M.J., & Green D.R. (2010). **Mitochondria in cell death.** *Essays in Biochemistry*, 47, 99–114. <https://doi.org/10.1042/BSE0470099>
- Peters J.M., & Ansari M.Q. (2011). **Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 135(1), 44–54. <https://doi.org/10.5858/2010-0387-rar.1>
- Pfeffer C.M. & Singh A.T.K. (2018). **Apoptosis: a target for anticancer therapy.** *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Pistritto G., Trisciuglio D., Ceci C., Garufi A. & D’Orazi G. (2016). **Apoptosis as anticancer mechanism : function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies.** *Aging*, 8(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- Poon I., Baxter A.A., Lay F.T., Mills G.D., Adda C.G., Payne J.A., Phan T.K., Ryan G.F., White J.A., Veneer P.K., van der Weerden N.L., Anderson M.A., Kvensakul M. & Hulett M.D. (2014). **Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis.** *eLife*. 3.e01808. <https://doi.org/10.7554/eLife.01808>
- Prebet T., & Vey N. (2011). **Vorinostat in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.** *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 20(2), 287–295. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.542750>
- Ren S.X., Shen J., Cheng A.S., Lu L., Chan R L., Li Z.J., Wang X.J., Wong C.C., Zhang L., Ng S.S., Chan F.L., Chan F.K., Yu J., Sung J.J., Wu W.K. & Cho C.H. (2013). **FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells.** *PloS one*, 8(5), e63641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063641>
- Salgado-Lora M.G., Medina-Estrada I., López-Meza J.E., & Ochoa-Zarzosa A. (2020). **Prolactin and estradiol are epigenetic modulators in Bovine mammary epithelial cells during staphylococcus aureus infection.** *Pathogens*, 9(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070520>
- Schuh A.C., Döhner H., Pleyer L., Seymour J.F., Fenaux P., & Dombret H. (2017). **Azacitidine in adult patients with acute myeloid leukemia.** *Critical Reviews in*

- Oncology/Hematology*, 116, 159–177. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.05.010>
- Shafee T.M.A., Lay F.T., Phan T.K., Anderson M.A. & Hulett M.D. (2017). **Convergent evolution of defensin sequence, structure and function**. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>
- Shi Y. (2002). **Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis**. *Molecular Cell*, 9(3), 459–470. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00482-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00482-3)
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., & Bray F. (2021). **Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Teixeira V., Feio M.J. & Bastos M. (2012). **Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes**. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Tornesello A.L., Borrelli A., Buonaguro L., Buonaguro F.M. & Tornesello M.L. (2020). **Antimicrobial peptides as anticancer agents: functional properties and biological activities**. *Molecules*, 25(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>
- Torres-Roman J.S., Valcarcel B., Guerra-Canchari P., Santos C.A., Barbosa I.R., La Vecchia C., ... de Souza D.L.B. (2020). **Leukemia mortality in children from Latin America: trends and predictions to 2030**. *BMC Pediatrics*, 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02408-y>
- Velázquez-Hernández M.E., Ochoa-Zarzosa A., & López-Meza J.E. (2021). **Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* improves butyrate cytotoxicity on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2**. *Electronic Journal of Biotechnology*, 52, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.04.009>
- Wang Z., Wu Z., Liu Y. & Han W. (2017). **New development in CAR-T cell therapy**. *Journal of Hematology and Oncology*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0423-1>
- Todd P., Metayer C., Wiemels J.L., Singer A.W. (2016). **Childhood leukemia and primary prevention**. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 46(10), 317–352.

<https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.08.004>. Childhood

- Wong J.H. & Ng T.B. (2005) **Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Bail).** *Peptides*, 24(7):963-8. doi: 10.1016/s0196-9781(03)00192-x.
- Wong J.H. & Ng T.B. (2005) **Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase.** *Peptides*. (7):1120-6. doi: 10.1016/j.peptides.2005.01.003.
- Wong J.H. & Ng T.B. (2006) **Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.).** *Peptides*. 26(11):2086-92. doi: 10.1016/j.peptides.2005.03.004.
- Xu X., Lai Y., & Hua Z.C. (2019). **Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials.** *Bioscience Reports*, 39(1), 1–17. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
- Yamashita M., Dellorusso P.V, Olson O.C. & Initiative S.C. (2020). **Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis.** *Nat Rev Cancer*, 20(7), 365–382. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0260-3>. Dysregulated
- Zhang M., Zhao J., & Zheng, J. (2014). **Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides.** *Soft Matter*, 10(38), 7425–7451. <https://doi.org/10.1039/c4sm00907j>
- Zhou H., & Xu R. (2015). **Leukemia stem cells : the root of chronic myeloid leukemia.** *Protein & Cell*, 6(6), 403–412. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0143-7>
- Zhuravel E., Shestakova T., Efanova O., Yusefovich Y., Lytvin D., Soldatkina M. & Pogrebnoy P. (2011) **Human beta-defensin-2 controls cell cycle in malignant epithelial cells: in vitro study.** *Exp Oncol*. 33(3):114-20. PMID: 21956461.