



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE FARMACIA

**“SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS  
FENÓLICOS MODULADORES DE LA METILACIÓN  
DEL ADN EN CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

L.F DIANA IRIS CASTRO VAZQUEZ

CO-DIRECTORAS:

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA  
DRA. MAYRA YANETH ANTÚNEZ MOJICA

CUERNAVACA, MORELOS. 2020

## JURADO

---

---

---

	<b>Nombre</b>	<b>Adscripción</b>
<b>Presidente</b>	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto	Facultad de Farmacia UAEM
<b>Secretario</b>	Dr. Erick Ayala Calvillo	Facultad de Farmacia UAEM
<b>Vocal 1</b>	Dra. Laura Patricia Álvarez Berber	Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) UAEM
<b>Vocal 2</b>	Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso	Facultad de Farmacia UAEM
<b>Vocal 3</b>	M.C. Silvia Marquina Bahena	Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) UAEM



# VOTOS APROBATORIOS

---

---



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA ACADÉMICA  
COORDINACION ACADEMICA

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



## VOTO APROBATORIO PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

**Nombre del alumno:** Diana Iris Castro Vázquez

**Título de la tesis:** "SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS  
MODULADORES DE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

- Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

28 de Mayo de 2020

Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2020-05-28 12:36:55 | Firmante  
f27W0UwSG8pB0h5apOjS/KdKggarVqzGj2h+8zeiTkotwy+LZTv0NmGUjoksXWRajHHOxAP3gxKku8d6zq/8bYyhcnB8uOJX0+8s9zmO11Th21gw5goad7iWTSPXgP79OUNcgT  
wEYp+3EEKYInYdJf6wDTMkQuDm0UE/qLLPaZBtWS9XpPTGe/cv5+GJuAEILRQkgaJyV8Wlodt+3bdGcrSpbeTbremKdZbO8LDmfeSw8OWtNGDW3E3Lkve4B7DN0AjU3m  
CC/wJCrEOap4m1Fy3+7NXUi08tQqkx9e8WwWrHVjdNBNeLjnaT8cpE4GRqPvJ9xHSxUXINIXfGA==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[bPRmhTf4\\$Ug](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/w70Aiw7OINR0ZtJ8ruTb84oVZpFWN7Pt>



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
COORDINACIÓN ACADÉMICA



Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana Iris Castro Vázquez

**Título de la tesis:** "SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS  
MODULADORES DE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Erick Ayala Calvillo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*Ayala Calvillo Erick*

29 de mayo del 2020

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA ACADÉMICA  
COORDINACION ACADEMICA



Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana Iris Castro Vázquez

**Título de la tesis:** "SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS  
MODULADORES DE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Laura Patricia Alvarez Berber

31-05-2020



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA ACADÉMICA  
COORDINACION ACADEMICA

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana Iris Castro Vázquez

**Título de la tesis:** "SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS  
MODULADORES DE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Ma. De Lourdes Rodríguez Fragoso

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Dra. Lourdes Rodríguez Fragoso  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_ 28 Mayo 2020 \_\_\_\_  
Fecha



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARIA ACADÉMICA  
COORDINACION ACADEMICA

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Diana Iris Castro Vázquez

**Título de la tesis:** "SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS FENÓLICOS  
MODULADORES DE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** M.C. Silvia Marquina Bahena

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi  
decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

29-mayo-2020

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha



## AGRADECIMIENTOS

---

---

---

Agradezco el apoyo económico otorgado por CONACyT con clave de proyecto 893945. A mis tutoras, la Dra. Lety y la Dra. Mayra por su apoyo, consejos y paciencia en la realización de este trabajo. A mi comité tutorial: la Dra. Laura y la Dra. Jessy que también fueron parte importante para el desarrollo y culminación de este proyecto. El reconocimiento y agradecimiento también va dirigido a mis jurados revisores de tesis, los cuales hicieron posible que este trabajo fuera mejor y más completo. Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio, en especial a Majo, por su apoyo, asesoramiento, compañía y buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. A mis compañeros, no del laboratorio, pero sí de generación y de carrera, especialmente a Moni, que siempre ha estado cercana para estresarnos, quejarnos, ayudarnos y reír juntas a lo largo de esta aventura llamada maestría, y aún desde mucho tiempo atrás al inicio de la licenciatura.

Quiero agradecer profundamente a aquellos que no fueron partícipes directos de este trabajo pero que siempre estuvieron tras de mí, brindándome todo el apoyo ya fuera económico o emocional, me refiero a mi familia: mi esposo, mis padres, mi hermana y mi abuelo, los cuales durante estos dos años soportaron mis lapsos de estrés y quejas y siempre estuvieron ahí para escucharme y decirme ¡Tú puedes! Hoy, con esta tesis en mano, me enorgullezco de decirles ¡Sí pude! ¡Y voy por más!

# CONTENIDO

<b>I. GLOSARIO.....</b>	<b>13</b>
<b>II. ABREVIATURAS.....</b>	<b>16</b>
<b>III. RESUMEN.....</b>	<b>17</b>
<b>IV. ABSTRACT.....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 CÁNCER Y EPIGENÉTICA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 CÁNCER HEPÁTICO: ESTADÍSTICAS Y ALTERACIONES EPIGENÉTICAS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 METILACIÓN DEL ADN.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE DNMT.....</b>	<b>24</b>
.....	<b>25</b>
<b>2.5 INHIBIDORES DE DNMT ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS Y SU MECANISMO.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 INHIBIDORES DE DNMT NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7 GENERALIDADES DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 BIOSÍNTESIS Y CLASIFICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....</b>	<b>28</b>
.....	<b>30</b>
<b>2.9 CITOTOXICIDAD DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y DERIVADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.10 COMPUESTOS FENÓLICOS COMO INHIBIDORES DE DNMT.....</b>	<b>31</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 OBJETIVO GENERAL:.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....</b>	<b>35</b>
<b>6. MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1 SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS.....</b>	<b>37</b>
6.1.1 <i>Métodos generales.....</i>	<b>37</b>
6.1.2 <i>Metodología general para la semisíntesis de derivados esterificados.....</i>	<b>37</b>
6.1.4 <i>Metodología general para la semisíntesis de derivados O-metilados.....</i>	<b>42</b>
6.1.5 <i>Obtención de los derivados O-metilados. Condiciones particulares.....</i>	<b>44</b>
<b>6.2 EVALUACIONES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS OBTENIDOS.....</b>	<b>45</b>
6.2.1 <b>CULTIVO CELULAR.....</b>	<b>45</b>
6.2.2 <i>Ensayo de MTS en células Hep3B e IHH.....</i>	<b>45</b>
6.2.3 <i>Determinación del nivel de metilación del ADN.....</i>	<b>45</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>7.1 OBTENCIÓN DE DERIVADOS.....</b>	<b>48</b>
7.1.1 <i>Derivados ésteres.....</i>	<b>48</b>
7.1.2 <i>Derivados O-metilados.....</i>	<b>50</b>
<b>7.2 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE DERIVADOS.....</b>	<b>51</b>

7.2.1 Actividad citotóxica de derivados ésteres.....	51
7.2.2 Actividad citotóxica de derivados O-metilados .....	52
7.3 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE METILACIÓN DEL ADN.....	53
7.4 ANÁLISIS GLOBAL DE LAS ACTIVIDADES EVALUADAS DE CADA DERIVADO .....	53
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>62</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>63</b>
11.1 PROTOCOLO DE CELLTITER96® AQUEOUS ONE SOLUTION CELL PROLIFERATION ASSAY (MODIFICADO) .....	71
11.2 PROTOCOLO DEL KIT AQUAPURE GENOMICS DNA DE BIORAD #CATÁLOGO 732-6340 (EXTRACCIÓN DE ADN, MODIFICADO).....	71
11.3 PROTOCOLO DEL KIT METHYLFLASH™ METHYLATED DNA QUANTIFICATION KIT (COLORIMETRIC) DE EPIGENTEK. ....	72
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de metilación de DNMT sobre citocina.....	24
<b>Figura 2.</b> Estructuras de isoformas de DNMT.....	25
<b>Figura 3.</b> Estructuras de inhibidores de DNMT análogos de nucleósidos.....	26
<b>Tabla 1.</b> Inhibidores no análogos de nucleósidos de DNMT.....	27-28
<b>Esquema 1.</b> Ruta biosintética resumida de ácidos fenólicos.....	29
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de ácidos fenólicos.....	30
<b>Tabla 3.</b> Inhibidores fenólicos de DNMT.....	32
<b>Esquema 2.</b> Reacción de esterificación de Fisher.....	38
<b>Esquema 3.</b> Reacción de metilación con DMS para derivados O-metilados.....	43
<b>Tabla 4.</b> Derivados esterificados, características y señal principal en RMN <sup>1</sup> H.....	48-49
<b>Tabla 5.</b> Derivados O-metilados, características y señal principal en RMN <sup>1</sup> H.....	50
<b>Tabla 6.</b> CI <sub>50</sub> de derivados esterificados en células Hep3B e IHH e índice de selectividad.....	51
<b>Tabla 7.</b> CI <sub>50</sub> de derivados O-metilados en células Hep3B e IHH e índice de selectividad.....	52
<b>Figura 4.</b> a) y b) Gráficas de derivados y su porcentaje de inhibición en células Hep3B.....	52
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los derivados y ácidos libres en la metilación global del ADN de células Hep3B.....	53

<b>Tabla 9.</b> Tipo y grado de actividad de cada derivado obtenido.....	54
<b>Figura 5.</b> Diagrama de Venn que clasifica a cada derivado en distintos grupos según el tipo y grado de actividad que haya presentado.....	54
<b>Espectros 1-14.</b> Espectros de RMN <sup>1</sup> H de cada derivado obtenido.....	64-70

## I. GLOSARIO

---

---

**143B:** Línea celular humana obtenida de células de osteosarcoma

**A431:** Línea celular humana derivada de carcinoma epidermial.

**143B:** Línea celular humana obtenida de células de osteosarcoma.

**A549:** Línea celular humana obtenida de células de carcinoma pulmonar.

**Ablación:** Extirpación de un órgano o tejido corporal.

**Ácido shikímico:** Intermediario bioquímico precursor de numerosos metabolitos secundarios de plantas

**Aducto:** En un contexto bioquímico se refiere a un complejo formado cuando un compuesto químico se une a una molécula de origen biológico como ADN

**BAX:** Enzima que participa en la permeabilización mitocondrial y tiene actividad pro-apoptótica en la vía intrínseca de la apoptosis celular.

**Bcl-2:** Familia de proteínas involucradas en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis celular y permeabilidad mitocondrial.

**B16F10:** Línea celular murina derivada de células de melanoma.

**Carbonilo:** Grupo funcional formado por un átomo de carbono unido por un doble enlace a un átomo de oxígeno.

**CDK:** Cinasas dependientes de ciclinas. Enzimas encargadas de regular el ciclo celular.

**CP4200:** Molécula diseñada como posible inhibidor de la enzima DNA metil transferasa.

**Cromatina:** Forma de organización del ADN dentro del núcleo. Se encuentra formada por ADN, ARN y proteínas.

**Cumarina:** Metabolito secundario presente en gran variedad de plantas y conocido por sus numerosas propiedades biológicas.

**COMT:** Catecol orto metil-transferasa. Enzima responsable de la degradación de catecolaminas. Transfiere un grupo metilo desde su cofactor S-adenosil metionina hacia el grupo catecol.

**DAPK1** (*Death-Associated Protein Kinase 1*): Enzima cuyo importante papel radica en la modulación positiva del interferón gamma para inducir la muerte celular programada. En diversos tipos de cáncer esta enzima se encuentra alterada o inactiva.

**DHAC:** Desacetilasa de histonas. Enzima encargada de quitar grupos acetilo de las histonas.

**Docking molecular:** Método utilizado para predecir la conformación de una molécula al unirse a otra para formar un complejo estable.

**DU145:** Línea celular humana derivada de células de tejido metastásico en cerebro cuyo sitio de origen del carcinoma fue la próstata.

**E-caderina:** Molécula que participa en la adhesión celular, mantiene las uniones célula-célula para la integridad de los tejidos.

**Embolización:** Proceso que consiste en ocluir voluntariamente vasos sanguíneos con intención terapéutica.

**Epifármaco:** Fármaco cuyo blanco terapéutico es alguna molécula implicada en algún evento epigenético como puede ser metilación de ADN, desacetilación de histonas, etc.

**Estilbeno:** Hidrocarburo aromático con fórmula  $C_{14}H_{12}$ . Su estructura es la base de numerosos metabolitos de plantas como los polifenoles.

**Genisteína:** Fitoestrógeno de la familia de las isofavonas aislada de *Genista tinctoria*. Se le atribuyen propiedades medicinales.

**Glutación:** Péptido constituido por glutamato, cisteína y glicina. Es un importante antioxidante celular.

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Ácido sulfúrico

**HaCaT:** Línea celular inmortalizada establecida a partir de queratinocitos

**HeLa:** Línea celular humana derivada de células de cáncer cervicouterino

**Hep3B:** Línea celular humana establecida a partir de células de carcinoma hepático. Las células además están infectadas con el virus de hepatitis B.

**Hidralazina:** Vasodilatador periférico directo. Actúa principalmente sobre arterias además de que altera el metabolismo del calcio.

**IHH:** Línea celular humana derivada de hepatocitos inmortalizados.

**Incidencia:** Es el número de casos nuevos de una enfermedad en una población definida y en un determinado tiempo.

**Islas CpG:** Regiones del ADN caracterizadas por una alta concentración de pares de citosina-guanina enlazadas por grupos fosfato.

**IRF5:** Factor regulador de interferón 5 (por sus siglas en inglés). Factor de transcripción que participa en la modulación del crecimiento celular, apoptosis, diferenciación celular, entre otros.

**Jurkat:** Línea celular inmortalizada establecida a partir de linfocitos T de un paciente con leucemia linfocítica aguda.

**Epigenética:** Rama de la genética que estudia cambios en la expresión de genes mediados por alteraciones en la cromatina u organización del ADN.

**Levantinib:** Medicamento utilizado para el tratamiento del cáncer principalmente de tipo tiroideo, hepático y renal. Es un inhibidor de múltiples cinasas.

**Lignano:** Metabolitos secundarios de plantas.

**LN-Cap:** Línea celular humana establecida a partir de células de cáncer prostático metastásico.

**logP:** Coeficiente de reparto, es un cociente entre las concentraciones de un compuesto no ionizado entre dos disolventes.

**MDA-MB-231:** Línea celular humana obtenida de células de cáncer de mama metastásico

**MG63:** Línea celular humana obtenida a partir de células de un paciente con osteosarcoma.

**MG98:** Molécula diseñada como inhibidora de la enzima DNA metiltransferasa, actualmente se encuentra en estudios clínicos.

**MGMT** (Metilguanina-DNA metil transferasa): Enzima de reparación del ADN. Repara el ADN removiendo grupos alquilo del ADN.

**MV411:** Línea celular humana establecida a partir de macrófagos de un paciente con leucemia mielomonocítica.

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Sulfato de sodio

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonato de sodio

**Neubauer (cámara):** Dispositivo utilizado para hacer recuento de células u otros organismos bajo el microscopio.

**NPY:** Neuropeptido Y. Participa en diversos procesos como homeostasis energética, regulación del apetito, cognición y ritmo circadiano.

**K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonato de potasio

**L-132:** Línea celular humana establecida a partir de. Además, las células están contaminadas con el virus del papiloma humano.

**Nucleosoma:** Unidad fundamental de la cromatina. Está formado por un octámero de histonas alrededor de las cuales se enrolla una hebra de ADN de longitud aproximada de 146 pb.

**Nucleótido:** Molécula orgánica conformada por una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato.

**P16<sup>INK4A</sup>:** Inhibidor dependiente de cinasa dependiente de ciclina 2<sup>a</sup>. Es una proteína supresora de tumores, tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular.

**p38:** También llamado p38MAPK es una cinasa intracelular que es activada por estrés celular y regula numerosos procesos relacionados a inflamación.

**PI3K/Akt:** Vía de señalización intracelular que participa en la regulación del ciclo celular, por lo tanto, interviene directamente en procesos como la proliferación celular, el desarrollo de cáncer y longevidad.

**PTEN:** Supresor tumoral. Es una proteína fosfatasa que desfosforila proteínas en los residuos de tirosina, serina y treonina.

**Policétido:** Metabolito secundario sintetizado por polimerización de subunidades de acetilo.

**RASSF1A:** Gen que codifica proteínas de la familia RASS que funcionan como supresores de tumores.

**Región promotora:** Secuencia de ADN que participa en la activación o inactivación de un gen. Es un sitio de unión de enzimas implicadas en el inicio de la transcripción.

**RG-108:** Molécula novedosa diseñada como inhibidor de DNA metil-transferasas.

**S-adenosil metionina:** También llamada SAM, es un cofactor que participa en la transferencia de grupos metilo.

**SOX1:** Gen que codifica para un factor de transcripción que tiene un dominio de unión al ADN, participa principalmente en la neurogénesis.

**SOX17:** Factor de transcripción involucrado en la regulación del desarrollo embrionario.

**Tanino:** Metabolito secundario de plantas, de tipo fenólico.

**Taxol:** También llamado Paclitaxel, es un fármaco indicado para tratamiento de diversos tipos de cáncer. Actúa estabilizando los microtúbulos interfiriendo en la mitosis.

**TDRMT1 (tRNA aspartic acid methyl transferase 1):** Mejor conocida como DNMT2 es una enzima perteneciente a la familia de DNA metil transferasas encargada de metilar ARN específicamente.

**TIMP3:** Gen que codifica la enzima inhibidora de metaloproteasa 3. Esta proteína inhibe las metaloproteasas encargadas de degradar la matriz extracelular y contribuir al desarrollo de metástasis.

**Tripsina:** Enzima de tipo peptidasa que rompe enlaces peptídicos para degradar proteínas. En cultivo celular se utiliza para desprender la monocapa de células adherentes.

**Valprotato:** Fármaco antiepiléptico indicado, además de la epilepsia, para algunos padecimientos psiquiátricos. Recientemente, se han descubiertos sus propiedades como epifármaco.

**Xantona:** Compuesto orgánico presente en algunos aceites esenciales y ampliamente sintetizado a nivel industrial por sus numerosas aplicaciones, entre ellas como insecticida.

**WNT/ βcatenina:** Vía de señalización intracelular tiene un papel importante en el desarrollo del organismo y la regulación de la aparición de tumores.

## II. ABREVIATURAS

---

---

**°C:** Grados Celsius.

**δ:** Desplazamiento químico.

**μM:** Micromolar.

**aa:** Aminoácidos.

**AcOEt:** Acetato de etilo.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AdoMet:** Adenosil metionina.

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**ATP:** Trifosfato de adenosina.

**CC:** Cromatografía en columna.

**CCF:** Cromatografía en capa fina.

**CDA:** Citidina desaminasa (enzima).

**CDCl<sub>3</sub>:** Cloroformo deuterado.

**CI<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria media.

**CoA:** Coenzima A.

**COMT:** Catecol orto metil-transferasa.

**CpG:** Dinucleótidos citocina-guanina.

**DMEM:** Medio mínimo esencial modificado de Eagle Dubbelco.

**DMS:** Dimetilsulfato.

**DMSO:** Dimetilsulfóxido.

**DNMT:** DNA metil-transferasa.

**DNMTi:** Inhibidor de DNA metil-transferasa.

**EGCG:** Epigallocatequina 3 galato.

**FDA:** *Food & Drug Administration*.

**GSH:** Glutation.

**H:** Protón.

**h:** Horas.

**HACs:** Acetilinasas de histonas.

**HDACs:** Desacetilasas de histonas.

**Hex:** Hexano.

**MHz:** Megahertz.

**mg:** miligramos.

**mL:** mililitros.

**MTS:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal inerte.

**N:** Normalidad.

**ncRNA:** RNA no codificante.

**NFκB:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

**nm:** nanomolar.

**PAL:** Fenilalanina amonio liasa (enzima).

**PBS:** Solución amortiguadora de fosfatos.

**PCNA:** Antígeno nuclear de células en proliferación (siglas en inglés).

**PEP:** Fosfoenol piruvato.

**P.F:** Punto de fusión.

**PM:** Peso molecular.

**RFD:** *Replication foci Domain*.

**RMN <sup>1</sup>H:** Resonancia magnética de protón.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**rpm:** Revoluciones por minuto.

**SAH:** S-adenosil homocisteína.

**SAM:** S-adenosil metionina.

**SFB:** Suero fetal bovino.

**t<sup>1/2</sup>:** Tiempo de vida media.

**TAL:** Tirosina amonio liasa (enzima).

**TRD:** *Target Recognition Domain*.



### III. RESUMEN

---

---

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 321 del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) bajo la dirección de la Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica y en el laboratorio 7 y el cuarto de cultivo de la Facultad de Farmacia bajo la dirección de la Dra. Leticia González Maya, ambos en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Numerosos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos poseen gran variedad de actividades biológicas, entre las que destacan sus propiedades citotóxicas, y más recientemente, su actividad sobre enzimas relacionadas a la metilación del ADN, por lo anterior, en este trabajo se sintetizaron catorce derivados de ácidos fenólicos de tipo benzoico y cinámico, diez derivados ésteres y cuatro derivados O-metilo. La purificación se realizó utilizando cromatografía en columna, los compuestos puros se caracterizaron mediante RMN  $^1\text{H}$ . Una vez obtenidos los derivados, se evaluó su actividad citotóxica en la línea celular de hepatocarcinoma Hep3B. Los derivados **5, 6, 7, 10, 11, 12, 14** no fueron citotóxicos ( $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) por lo que no se consideraron para posteriores evaluaciones. Los derivados de tipo cinámico sí fueron citotóxicos ( $\text{CI}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) lo que indica que el doble enlace alfa a carbonilo es importante para la citotoxicidad. Las modificaciones estructurales (esterificación y O-metilación) incrementaron la actividad citotóxica de los derivados cinámicos comparados con el ácido cafeico (molécula original) cuya  $\text{CI}_{50}$  fue mayor a  $100 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo, este no fue el caso para los derivados de tipo benzoico ya que tuvieron  $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ , comparados con el ácido gálico (molécula original), cuya  $\text{CI}_{50}$  es menor a  $100 \mu\text{g/mL}$  es claro la actividad citotóxica no se incrementó con las modificaciones estructurales como en el caso de los derivados cinámicos.

Los derivados de tipo cinámico ( $\text{CI}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) así como dos de tipo benzoico (**3** y **11**) se evaluaron como inhibidores de la metilación del ADN en células Hep3B. Tanto los derivados de tipo cinámico como benzoico fueron activos, esto indica que la actividad sobre la metilación del ADN no está relacionada al doble enlace alfa a carbonilo presente en los derivados de tipo cinámico. Todos los derivados evaluados tuvieron altos porcentajes de inhibición de la metilación del ADN, el compuesto menos activo (**4**) alcanzó un 63.08% de inhibición mientras que los derivados más activos (**8, 9** y **13**) tuvieron porcentajes de inhibición mayores a 90%. La adición de grupos metilo (esterificación y/o O-metilación) incrementó la actividad inhibitoria de la metilación de los derivados cinámicos respecto al ácido cafeico cuya inhibición fue de solo 39.88%, sin embargo, en los derivados de tipo benzoico (**3** y **11**) la adición de grupos metilo en la estructura no mejoró este tipo de actividad ya que estos compuestos tuvieron porcentajes de inhibición de 74.2% y 85.44% respectivamente. Comparados con el ácido gálico cuya inhibición de la metilación fue de 82.48% es evidente que no hubo diferencias entre los derivados y la molécula original.

Los derivados **8, 9** y **13** se consideran los mejores candidatos debido a que fueron citotóxicos, selectivos y tuvieron altos porcentajes de inhibición de la metilación del ADN.

## IV. ABSTRACT

---

---

This work was performed in the laboratory 321 of the Chemical Research Center under the direction of the PhD. Mayra Yaneth Antunez Mojica and in the laboratory 7 and BSL-1 of the Faculty of Pharmacy under the direction of the PhD. Leticia González Maya, both at the Autonomic University of Morelos State.

There are numerous studies that have shown that the phenolic compounds have a great variety of biological activities, the cytotoxicity is one of the best known and recently their activity on DNA methylation has been demonstrated. In this study where synthesized fourteen derivatives from phenolic acids of benzoic and cinnamic type, ten where ester derivatives and four O-methylated derivatives. The purification was made by column chromatography and then, the molecules where characterized by NMR  $^1\text{H}$ . Once obtained, the cytotoxicity of the compounds was evaluated by the MTS method on a hepatocarcinoma cell line Hep3B. The derivatives **5**, **6**, **7**, **10**, **11**, **12** and **14** where not cytotoxic ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) for that reason, these compounds where not included for the next assays. The cinnamic derivatives where cytotoxic ( $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) which is an indicative that the double bound alpha to the carboxylic acid is necessary to the cytotoxic activity. The structural modifications (esterification and O-methylation) enhanced the cytotoxicity of the cinnamic compounds versus the caffeic acid (parental molecule) with a  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ , nevertheless, the benzoic derivatives ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ) versus the gallic acid (parental compound) whose  $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  demonstrate that the structural modifications not increased the cytotoxic activity in this case.

The cinnamic derivatives ( $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) as two benzoic compounds (**3** and **11**) where evaluated as DNA methylation inhibitors in Hep3B cells. In this case, both kind of compounds where active, this is an indicative that the inhibition of DNA methylation is not related to the double bound alpha to the carboxylic acid. All the compounds evaluated in this assay where active as DNA methylation inhibitors, the molecule **4** was the less active with a 63.08% of inhibition, in the other hand, the most active compounds where the derivatives **8**, **9** and **13** with a DNA methylation inhibition higher than 90%. The esterification and/or O-methylation enhanced the inhibitory activity of cinnamic compounds versus the caffeic acid (parental compound) whose inhibition of DNA methylation was 39.88%, but in the case of the benzoic derivatives the activity on DNA methylation was not increased with the structural modifications. The inhibition of DNA methylation was 74.2% and 85.44% respectively to the derivatives **3** and **11** while the gallic acid (parental compound) had 82.48% of DNA methylation inhibition.

The derivatives **8**, **9**, and **13** where cytotoxic, selective and had a high inhibitory effect on DNA methylation for that reason are the best candidates for future research.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

---

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y es una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad. Además del enorme problema de salud que representa, es también una de las enfermedades más costosas cuyo gasto asciende a billones de dólares cada año. El término cáncer se refiere a un grupo de enfermedades que comparten una característica: la proliferación descontrolada de células anormales con capacidad de invadir otras áreas y tejidos. Por lo tanto, el cáncer es en realidad un conjunto de enfermedades de diversa etiología, con distintos mecanismos bioquímicos y dependiente del contexto celular, por lo que cada tipo de cáncer requiere un tratamiento en particular (OMS, 2018). Pese a los avances tecnológicos y la gran variedad de medicamentos disponibles en el mercado, diversos factores como la variabilidad genética, la diversidad entre los tipos de cáncer, la resistencia a los fármacos, entre otros, influyen en que a la fecha no exista una cura definitiva para el cáncer. Los casos de éxito son pocos para un problema de salud que viene en aumento, por lo tanto, la investigación enfocada al descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticancerígena continúa vigente (National Cancer Institute, 2018)

Se ha comprobado que agentes externos como estilo de vida, alimentación, sedentarismo, contaminación, por mencionar algunos, pueden influir en el desarrollo de algún tipo de cáncer, por lo anterior, en años recientes ha surgido una nueva vertiente en la investigación: la epigenética y su relación con carcinogénesis. La epigenética, en su definición más simple es “la regulación génica mediada por modificaciones de la estructura de la cromatina” es decir “cambios en la expresión genética que son independientes de la secuencia de nucleótidos” (Delgado-Coello, 2011). Desde este enfoque epigenético, el estudio de eventos como la metilación del ADN y los blancos moleculares implicados en este proceso como las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT), que se encargan de la adición de grupos metilo en sitios específicos ha cobrado interés. Al ocurrir un desequilibrio en el estado de metilación del ADN, suceden cambios en la estructura y estabilidad de la cromatina y, en consecuencia, la represión de genes supresores de tumores y desarrollo de neoplasias (Johnson et. al. 2015).

Actualmente existen en el mercado solo dos fármacos inhibidores de DNMT que modulan este proceso de metilación: Decitabina (Dacogen®) y Azacitidina (Vidaza®), indicados para el tratamiento de diversos tipos de leucemia (Gros et al.2012), sin embargo, presentan varias limitantes como toxicidad e inestabilidad química, además de la falta de epifármacos indicados para tratamiento de tumores sólidos. Por lo anterior, actualmente existe un creciente interés por la búsqueda de moléculas con actividad inhibitoria de las enzimas DNA metil-transferasas o moduladores de la metilación. Por tal motivo en este trabajo, se evaluó la citotoxicidad y actividad inhibitoria de la metilación del ADN, de derivados de ácidos fenólicos, los cuales han demostrado ser activos (Link et al. 2010).

## **2. ANTECEDENTES**



## 2.1 Cáncer y epigenética

El cáncer es un grupo de enfermedades relacionadas que comparten la característica de una proliferación descontrolada de células anormales, las cuales pueden migrar e invadir otros tejidos, proceso conocido como metástasis. Las causas que llevan al desarrollo de algún tipo de cáncer son numerosas y de muy diverso origen, y pueden ser resultado de interacciones entre factores genéticos, así como factores externos (National Cancer Institute, 2018). Estos factores pueden clasificarse en tres tipos: agentes físicos, agentes químicos y agentes biológicos, que en conjunto con la predisposición genética del individuo o por sí mismos pueden desencadenar carcinogénesis (OMS, 2018). En el dogma central de la oncología este proceso de transformación de células normales a células malignas solía asociarse principalmente a mutaciones del genoma, es decir, cambios en la secuencia del ADN, sin embargo, en años recientes se ha ampliado el panorama en la investigación tomando un nuevo enfoque: la epigenética (Bo, Li y Wang, 2016). Esta es un área emergente que estudia aquellos cambios provocados por un estado activo o inactivo de los genes y que no implica ninguna modificación en la secuencia del ADN. Como su nombre lo indica *epi*= por encima o sobre, la epigenética se refiere a un cambio a la manera en cómo el ADN se ordena y no a una modificación en su secuencia por lo que es un cambio fenotípico y no genotípico (Eltanski, 2018).

Los eventos epigenéticos son aquellos mecanismos a través de los cuales ocurren modificaciones en la estructura de la cromatina. Estos eventos son: metilación del ADN, modificaciones de histonas, remodelación de nucleosomas dependiente de ATP y silenciamiento de genes asociado a ncRNA. Los dos primeros son los más estudiados y para los cuales incluso ya se han desarrollado fármacos (Morera et al. 2016).

La cromatina puede adoptar dos configuraciones: eucromatina que es una forma laxa y accesible para la maquinaria transcripcional, y heterocromatina que es una estructura condensada e inaccesible. La forma que ésta adopte dependerá del nivel de metilación del ADN, fenómeno regulado por las enzimas DNA metil-transferasas (DNMT), así como la acetilación de histonas en los nucleosomas, regulado por las acetilasas de histonas (HACs) y desacetilasas de histonas (HDACs), entre otras modificaciones post-traduccionales que las histonas pueden sufrir. En células normales existe un equilibrio entre estos niveles, lo que permite mantener la estabilidad de la estructura de los nucleosomas y la accesibilidad de la maquinaria transcripcional. El estado de metilación y acetilación normal tiene también un importante papel regulatorio al reprimir la expresión de genes específicos y permitir la diferenciación celular, sin embargo, alteraciones en estos niveles como pueden ser un estado hipermetilado del DNA y desacetilación de histonas conducen a un silenciamiento aberrante de genes que en consecuencia llevan a una transformación maligna de las células. Un déficit en la metilación, es decir, hipometilación también genera una pérdida en la estabilidad de la estructura de los nucleosomas, lo que también se traduce en daños celulares (Bo et al. 2016). La desregulación de eventos epigenéticos se asocia al desarrollo de numerosas enfermedades como trastornos mentales, cardíacos, enfermedades inmunes y varios tipos de cáncer, no obstante, la relación entre los eventos epigenéticos y el desarrollo de cáncer es donde se han logrado más avances en la investigación. A diferencia de las mutaciones que puede sufrir el ADN en su secuencia y que son irreversibles, las modificaciones epigenéticas son reversibles por lo que un restablecimiento del estado normal de metilación y acetilación puede

llevar a la re-expresión de genes. Por lo anterior, las moléculas implicadas en estos mecanismos epigénéticos han cobrado importancia como novedosos blancos moleculares para el desarrollo de una nueva generación de fármacos conocido como epifármacos (Gros et al. 2012).

## **2.2 Cáncer hepático: estadísticas y alteraciones epigenéticas**

El carcinoma hepatocelular también llamado cáncer de hígado o hepatocarcinoma afecta la unidad fundamental del hígado, es decir, los hepatocitos. Ésta es la variante más común de cáncer hepático en adultos. Cuando el cáncer se origina en el hígado se le denomina cáncer de hígado primario, no obstante, también es posible que el cáncer no se haya originado en este órgano si no que se propagó por metástasis desde su sitio de origen en otro órgano o tejido; cuando esto sucede se le denomina cáncer secundario (American Cancer Society, 2018).

La incidencia de cáncer hepático ha aumentado en las últimas décadas y es uno de los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad. Para este año (2019), la Sociedad Americana Contra el Cáncer estimó el diagnóstico de 42030 casos de cáncer hepático solo en EE.UU. así como 31780 muertes por esta causa. A nivel mundial representa alrededor de 700 000 muertes por lo que se encuentra dentro de los 10 tipos de cáncer más comunes. La tasa de supervivencia estimada a cinco años es solo del 18.4% debido generalmente a un diagnóstico tardío. En regiones como el África subsahariana y Asia del Pacífico se presenta la mayor incidencia, además de que factores como infecciones previas por hepatitis, cirrosis y el sexo (masculino) son factores de riesgo (National Cancer Institute, 2018). En México, el panorama no es alentador, el hepatocarcinoma se encuentra dentro de los cinco tipos de cáncer más comunes en ambos sexos (infocancer.org). Además, un estudio realizado en 2017 (Reynoso-Noveron & Torres-Domínguez) señala que las tasas de mortalidad de algunos tipos de cáncer, incluido el de hígado, aumentan constantemente cada año. Asimismo, en ese estudio, se estimó que para 2020 solo el cáncer de hígado y ovario, provocarán un mayor número de muertes, a diferencia de otros tipos que se mantendrán igual o disminuirán.

Los tratamientos para el cáncer hepático abarcan cirugía, ablación, radioterapia, embolización, inmunoterapia, terapia dirigida y quimioterapia, de la cual solo existen dos opciones de primera línea para este tipo de cáncer (sorafenib y lenvatinib), sin embargo, los casos de éxito son pocos (American Cancer Society, 2018).

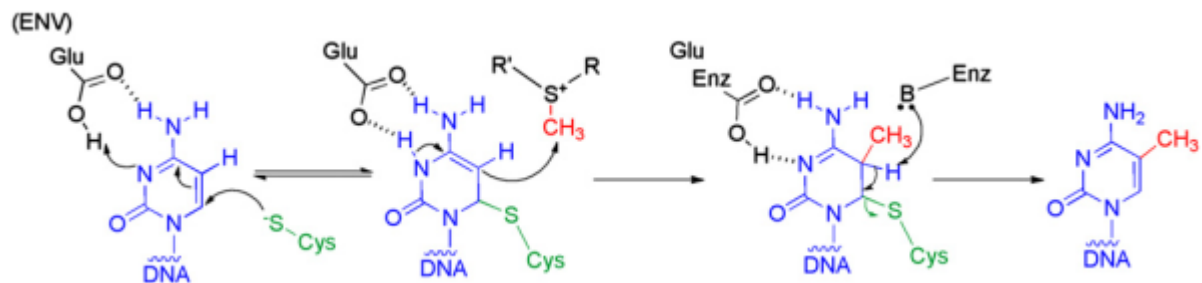
Como se mencionó anteriormente, el término epigenética se usa para referirse a los cambios en la forma en la que se expresan los genes y en la organización de la cromatina, dichos cambios son independientes de la secuencia del ADN. Dentro de las alteraciones epigenéticas se encuentra la metilación del ADN. Un estado alterado de la metilación, como la hipermetilación de regiones promotoras específicas conlleva a un silenciamiento de genes y al desarrollo de cáncer, este tipo de alteraciones se han encontrado en hepatocarcinoma (Raggi, 2013). Existen numerosos estudios que demuestran diferencias entre el patrón de metilación de células de tumores hepáticos y células de tejido adyacente no cancerosas (Hernández-Vargas et al. 2010). Como resultado, de estos estudios se ha encontrado hipermetilación aberrante en genes supresores de tumores en células de hepatocarcinoma como E-caderina, RASSF1A, PTEN, p16<sup>INK4</sup>, estas alteraciones generan descontrol de ciclo celular promoviendo así la proliferación. Otros autores (Shin et al. 2010) han analizado las diferencias entre los perfiles de metilación de células de hepatocarcinoma y células normales de hepatocitos, encontrando hipermetilación en otros genes involucrados en la apoptosis

como IRF5 y TNFRSF10C, proliferación celular como NPY. Se sabe también, que importantes reguladores de la vía de señalización WNT/ $\beta$  catenina como SOX1 y SOX17 (Hamilton, JP. 2010) se encuentran hipermetilados en células de hepatocarcinoma, como consecuencia, la proliferación y supervivencia de estas células es mayor.

### **2.3 Metilación del ADN**

La metilación del ADN es un evento que en células sanas tiene como función la diferenciación celular y mantenimiento de una estructura estable del genoma. Alteraciones en los niveles de metilación pueden desencadenar tumorigénesis a través de dos vías: una pérdida global de metilación que provoca inestabilidad genética y cromosómica o, por el contrario, un estado hipermetilado en regiones promotoras de genes supresores de tumores que lleva a un estado inactivo o silenciamiento de estos (Subramanian et al. 2014). La metilación del ADN es catalizada por una familia de enzimas llamadas DNA metil-transferasas (DNMT) que utilizan la S-adenosilmetionina (SAM o AdoMet) como cofactor y donador del grupo metilo. Este grupo de enzimas tiene importantes funciones como el mantenimiento de patrones de metilación durante diversas etapas del desarrollo. En mamíferos se conocen cuatro isoformas de la enzima: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B DNMT3L y DNMT2 también llamada TDRMT1.

La metilación ocurre principalmente en los llamados sitios o islas CpG, dinucleótidos de citosina-guanina, específicamente en el C5 del anillo de pirimidina de la citosina. Las islas CpG se encuentran principalmente en regiones promotoras por lo que una hipermetilación en estos sitios dificulta su reconocimiento por factores de transcripción llevando al silenciamiento de genes (Gnyzka et al. 2013). El mecanismo de metilación de CpG sucede a través de un ataque nucleofílico de la enzima hacia el C en posición 6 de la citocina. En su sitio catalítico, la enzima tiene una región de Prolina-Cisteína-Glutamina (PCQ), un grupo tiol de este residuo de cisteína es el que lleva a cabo el ataque nucleofílico al C6 de la citocina formando una enamina. El ataque a la posición 6 es favorecido por la protonación del anillo de citocina, específicamente por el N en posición 3, esta protonación es estabilizada por un residuo de glutamina. Esta pérdida de densidad electrónica en el anillo de pirimidina genera la activación de C5, el cual puede ser estabilizado por resonancia o por un residuo de arginina. El C5 que acepta al grupo metilo de la SAM por medio de un ataque electrofílico y forma un aducto covalente entre la enzima y el ADN liberando una S-adenosil homocisteína (SAH). Después de la adición del grupo metilo, un residuo básico del sitio catalítico de DNMT atrae un protón de la posición 5 permitiendo la liberación de la enzima por  $\beta$ -eliminación (Gros et al. 2012).



**Figura 1.** Mecanismo de metilación de DNMT sobre citosina

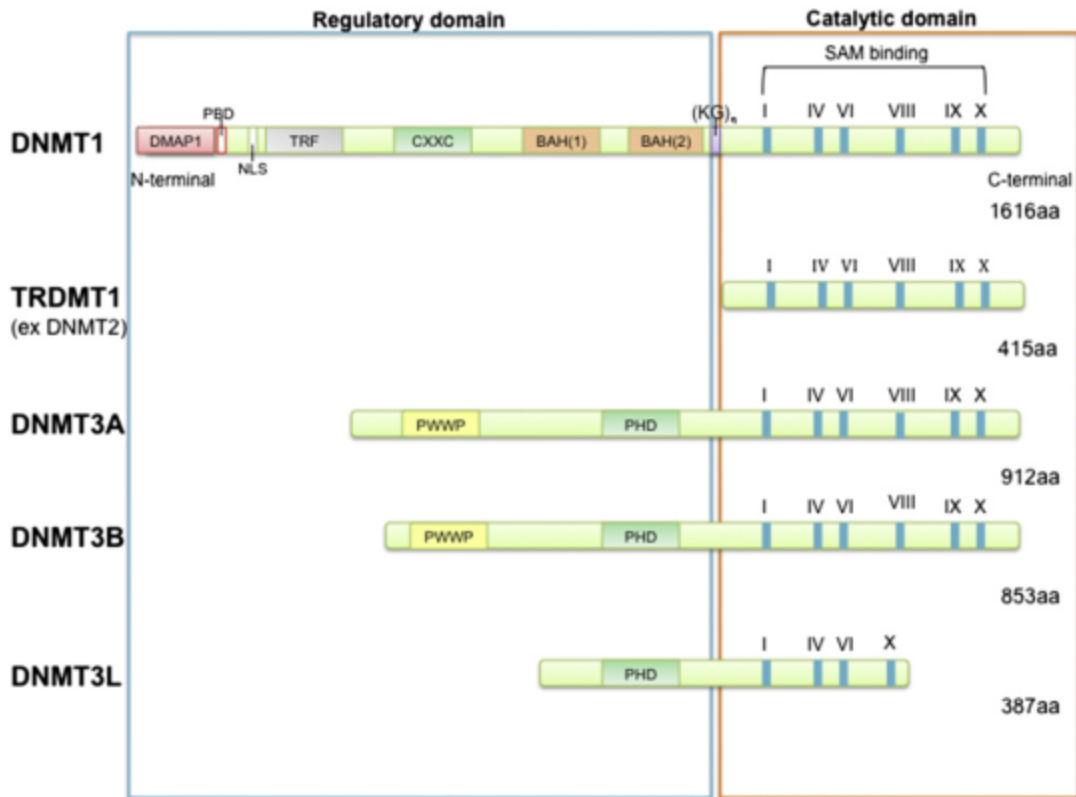
## 2.4 Estructura y funciones de DNMT

En mamíferos, la familia de enzimas DNMT comprende cuatro miembros activos y una quinta isoforma que carece de sitio catalítico y tiene una función más bien reguladora. En conjunto estas enzimas tienen un importante papel en el establecimiento y mantenimiento de patrones de metilación durante diferentes etapas como gametogénesis, embriogénesis y desarrollo de diversos tejidos. La estructura general de las DNMT comprende un dominio catalítico C-terminal y un dominio regulatorio N-terminal. El dominio C-terminal está constituido por diez aminoácidos que conforman el sitio de unión al cofactor SAM y al sustrato (Gros et al. 2012). Las unidades I y X son los sitios que participan en la unión al cofactor mientras que las unidades IV, VI y VIII son los sitios de unión específicos al sustrato. La unidad IV contiene un dipéptido Prolina-Cisteína donde se ubica el grupo tior que participa en el ataque nucleofílico al C6 de la citosina. En el sitio VI se ubica el residuo de glutamina que promueve la protonación en la posición 3 de la citosina. Por su parte el sitio IX corresponde al llamado dominio de reconocimiento del blanco o TRD por sus siglas en inglés (*Target Recognition Domain*). Dentro del dominio regulatorio N-terminal se encuentran numerosos sitios de reconocimiento para proteínas que dirigen la ubicación de la DNMT. (Yoo & Medina-Franco, 2013).

La isoforma DNMT1 está formada por 1616 aa, se le conoce como de mantenimiento ya que se encarga de conservar el patrón de metilación durante la replicación. Las isoformas 3A y 3B son menos abundantes en células somáticas, su función es establecer el patrón de metilación durante la embriogénesis por lo que se denominan *de novo*. Estas isoformas contienen en su estructura una secuencia Prolina-Triptofano-Triptofano-Prolina (PWWP) que facilita la unión directa al ADN (Zhang et al. 2015). Si bien la isoforma DNMT1 se denomina de mantenimiento mientras que las isoformas 3A y 3B son las denominadas *de novo*, existe evidencia de que tanto la isoforma 1 puede actuar también durante la metilación *de novo* como de que las isoformas 3A y 3B cooperan en el mantenimiento de la metilación por lo que algunos autores están reconsiderando esta clasificación estricta en los papeles de ambas isoformas. DNMT3L carece de sitio catalítico por lo que carece de actividad por sí misma, no obstante, se ha encontrado que actúa como cofactor de la isoforma 3A favoreciendo la interacción con el grupo metilo donado por la SAM. La isoforma DNMT2 también llamada TRDMT1 es la más pequeña, carece del dominio N-terminal regulatorio. Se ha comprobado que la ausencia de esta enzima no conlleva cambios fenotípicos por lo que se cree que



no tiene un papel fundamental durante la embriogénesis si no durante el desarrollo del organismo reconociendo daños al DNA (Subramanian et al. 2014).

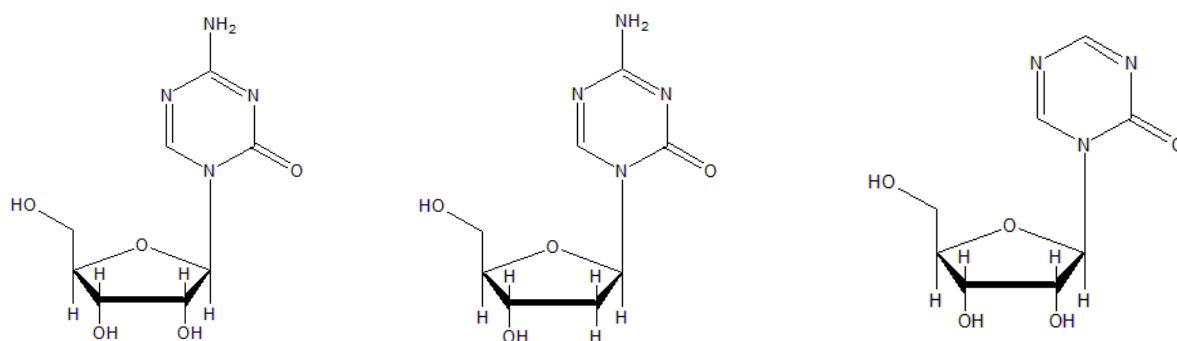


**Figura.2.** Estructura de las isoformas de DNMT. Se muestran cada uno de los dominios. Tomado de *DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches* (Gros et al. 2012).

## 2.5 Inhibidores de DNMT análogos de nucleósidos y su mecanismo

Las moléculas con actividad inhibitoria sobre DNMT son muy diversas estructuralmente, sin embargo, pueden clasificarse en dos grandes grupos: análogos de nucleósidos y no análogos. Al primer grupo pertenecen los dos únicos epifármacos inhibidores de DNMT en el mercado: Azacitidina (Vidaza ®, Celgene®) y Decitabina (Dacogen®, SuperGen®) aprobados en 2004 y 2006 respectivamente por la FDA para el tratamiento de leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico (Aguilera-Castillo et al. 2017). El mecanismo de acción de azacitidina y decitabina ocurre a través del transporte de estas moléculas por el transportador de nucleósidos hacia las células, posteriormente la molécula de fármaco es fosforilada por enzimas cinasas, la forma trifosfatada que ya es activa se incorpora a la hebra recién sintetizada de ADN o ARN. La azacitidina (5-azacitidina) se incorpora al RNA debido a que es un ribonucleósido y en menor medida es incorporado al ADN mientras que decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina) es incorporada

únicamente al ADN. La integración del fármaco con ADN o ARN impide la unión de la enzima DNMT, específicamente por la sustitución del carbono en posición 5 por un átomo de N, esta modificación estructural genera la formación de un complejo irreversible entre la enzima y el DNA inhibiendo la DNMT. Después de la replicación, las células hijas perderán paulatinamente la metilación en C5 de la citocina conduciendo así a un restablecimiento progresivo del estado de metilación normal de las células (Champion et al. 2010). Desafortunadamente tanto azacitidina como decitabina son moléculas química y metabólicamente inestables con  $t_{1/2}$  de 41 y 25 minutos respectivamente; asimismo, como la mayoría de los fármacos oncológicos, estas moléculas no son selectivas y muestran una elevada toxicidad por lo que se han desarrollado otros análogos de nucleósidos tratando de aminorar estos inconvenientes. Existe un tercer miembro análogo de nucleósidos: Zebularina, que ha mostrado ser más estable y menos tóxico. Esta molécula fue sintetizada originalmente como un inhibidor de citidina desaminasa (CDA), su mecanismo de inhibición de DNMT es ligeramente distinto a azacitidina y decitabina ya que zebularina carece del grupo amino en posición 6 del anillo de pirimidina, teniendo un C en dicha posición, este hecho evita la activación del C5 de la citocina impidiendo así la adición del grupo metilo; además dado su diseño original como inhibidor de DCA, zebularina tiene un mecanismo de acción dual como inhibidor de DNMT y como citidina-desaminasa. Si bien zebularina parecía el candidato ideal como el próximo epifármaco inhibidor de DNMT también presenta el inconveniente de ser menos potente por lo que requiere concentraciones elevadas (del orden milimolar) para su eficacia, lo cual ha frenado su aprobación ya que en la clínica se requerirían dosis altas y repetidas, así como tratamientos prolongados para alcanzar su efecto (Pechalrieu et al. 2017). Dados estos inconvenientes se han desarrollado otras moléculas análogas como SGI-110, un derivado de azacitidina diseñado para mejorar el perfil farmacocinético, en estudios *in vivo* mostró mayor estabilidad y menor toxicidad por lo que entró a estudios clínicos de fase II para el tratamiento de leucemia. Otra molécula afín es TdCyd diseñado para el tratamiento de tumores sólidos que se encuentra en estudios clínicos. El análogo 5-6-dihidro-5-azacitidina o DHAC alcanzó estudios de fase II para el tratamiento de melanoma. CP 4200 es otra molécula análoga de azacitidina que actúa como profármaco, estudios *in vivo* demostraron una mayor actividad antitumoral en comparación con azacitidina (Aguilera-Castillo et al. 2017).



**Figura 3.** Estructuras de DNMTi análogos de nucleósidos: azacitidina, decitabina y zebularina.

## 2.6 Inhibidores de DNMT no análogos de nucleósidos

A diferencia de los análogos de nucleósidos, los inhibidores no análogos poseen un mecanismo de acción distinto ya que estos no se incorporan al ADN además de que este grupo está constituido en su mayoría por moléculas que ya se ha demostrado tienen alguna actividad terapéutica y con blancos moleculares distintos. Este grupo está compuesto por moléculas que provienen de fuentes muy diversas como son productos naturales, productos de síntesis, fármacos ya aprobados, entre otros por lo que difieren estructuralmente. Uno de los casos más exitosos como inhibidor de DNMT o DNMTi no análogo de nucleósido es el de la hidralazina, fármaco aprobado para tratamiento de hipertensión el cual ha alcanzado estudios de fase I, II y III en pacientes con tumores sólidos (Dueñas-González et al. 2014). Los resultados de estos estudios demostraron que hidralazina logra reestablecer la metilación normal en genes supresores de tumores como DAPK1 y MGMT logrando así su reactivación. Hidralazina se encuentra también en estudios de fase II en combinación con valproato para el tratamiento de MDS. Procaína, un anestésico y su análogo procainamida, un antiarrítmico, también se han reportado como potenciales inhibidores de DNMT ya que en estudios *in vitro* la tasa de 5-metil citocina disminuyó en células Jurkat tratadas con el compuesto. Diversos productos naturales como psamplina A, aislada de esponjas marinas; nanaomicina A, un antibiótico tipo quinona aislado de *Streptomyces*, RG-108, un derivado de triptófano, entre otros son considerados potenciales inhibidores de DNMT al mostrar actividad en estudios *in vitro*, *in vivo* o *in silico*, pese a esto aún no hay datos concluyentes sobre la eficacia real de dichos compuestos por lo que ninguno ha sido aprobado (Medina-Franco & Caulfield, 2011).

**Tabla 1.** Algunos inhibidores no análogos de nucleósidos de DNMT ( Gros et al. 2012; Medina-Franco & Caulfield, 2011)

Compuesto	Efectos	Modelos	Fase de estudio
Nanaomicina A (Quinona)	Inhibidor de DNMT3B, re-expresión del gen RASSF1A	Tumores sólidos y hematológicos ( <i>in vitro</i> )	Preclínicos
Conjugados de procainamida	Actividad micromolar sobre inhibición de DNMT	Líneas celulares de tumores sólidos, ensayos enzimáticos	Preclínicos
SGI-1027 (Quinolona)	Depleción de DNMT1, pro-apoptótico moderado	Tumores sólidos y hematológicos	Preclínicos
Hidralazina	Re-expresión de genes DAPK1 y MGMT	Tumores de ovario, cerebro y hematológicos	Fase I, II y III
RGI08 (Derivado triptófano)	Reactiva genes P16 <sup>INK4A</sup> , TIMP3 <i>in vitro</i>	Líneas celulares de cánceres hematológicos	Preclínicos

Continúa

MG98 (oligonucleótido)	Re-expresión de P16, inhibición de expresión de DNMT1	Ratones desnudos, líneas de carcinomas de colon y páncreas	Fase I
---------------------------	---	--	--------

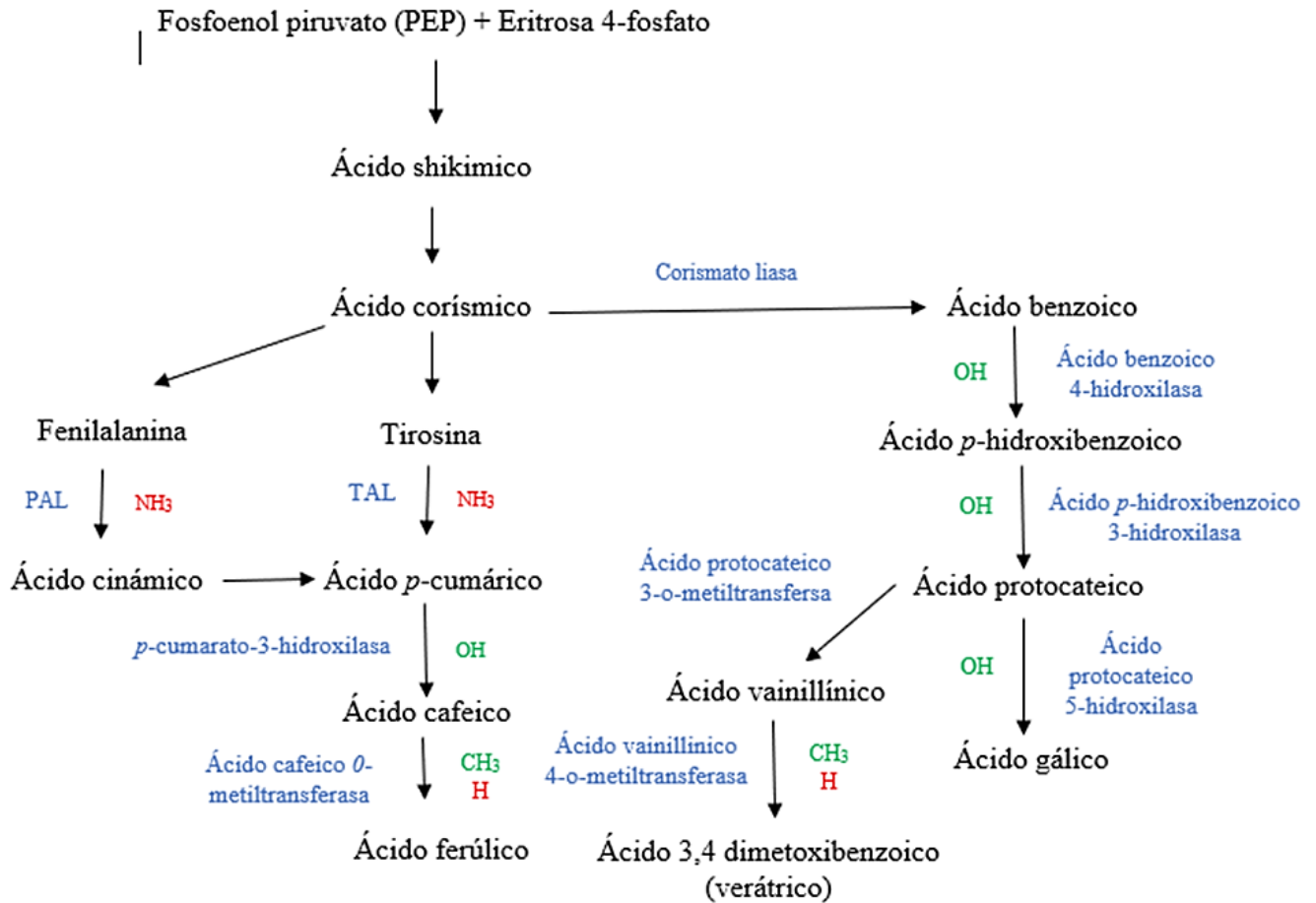
## 2.7 Generalidades de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que comprenden un amplio grupo de productos naturales. La característica estructural en común es la presencia de al menos un grupo fenol, es decir, un anillo aromático sustituido con uno o más grupos hidroxilo. La clasificación general se basa en su complejidad, teniendo así fenoles simples y complejos. Dentro de la categoría se encuentran cumarinas, lignanos, taninos, xantonas, estilbenos, entre otros (Anantharaju et al. 2016). La biosíntesis de los polifenoles ocurre en plantas a través de la ruta metabólica del ácido shikímico principalmente y en algunos casos por convergencia con la ruta de los policétidos. Debido a la importancia de estos metabolitos para la planta, se encuentran en la mayoría de las especies por lo que forman parte de la dieta al estar presentes en numerosos frutos y cereales (Heleno et al. 2015). Al ser los ácidos fenólicos (fenoles simples) el objeto de estudio de este trabajo, se abordarán a detalle sus características en apartados siguientes.

## 2.8 Biosíntesis y clasificación de ácidos fenólicos

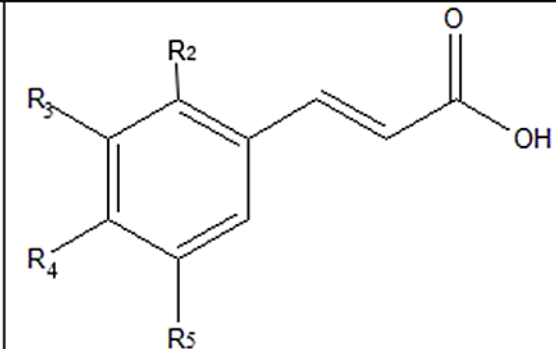
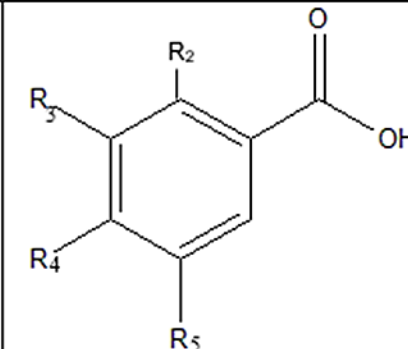
A través de la ruta del ácido shíkímico ocurre la biosíntesis de los ácidos fenólicos. Partiendo de una molécula fosfoenolpiruvato (PEP) y 4-eritrosa fosfato, ocurre una compleja serie de reacciones enzimáticas mediadas por una dehidrocinasa que en última instancia lleva a la generación del intermediario central: ácido shikímico. Posteriormente por acción de una corismato sintasa se obtiene el siguiente intermediario: ácido corísmico el cual tiene un enol éter como sustituyente. En general, la formación de ácido corísmico a partir de PEP y 4-eritrosa fosfato comprende una serie de siete reacciones enzimáticas. Teniendo el ácido corísmico formado, la síntesis de ácidos fenólicos puede ocurrir a través de dos vías: reacciones enzimáticas dependientes de CoA que formarán ácido benzoico o a través de reacciones de rearrreglos de la cadena lateral de enol-éter que generan el esqueleto  $C_6C_3$  de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. Tomando el ácido benzoico o los aminoácidos como esqueleto base, la biosíntesis de los ácidos fenólicos está dada por reacciones de oxidación, transaminación, descarboxilación mediadas por numerosas enzimas. La complejidad de estas reacciones depende en gran medida de la especie pudiendo variar la vía metabólica, el número de pasos, las enzimas involucradas entre otros factores (Dewick, 2009).

Los ácidos fenólicos son compuestos formados por un ácido carboxílico unido a un grupo fenol que comprende de un anillo de benceno y un grupo OH. Se clasifican en dos grupos dependiendo su esqueleto base, teniendo así a los derivados del ácido benzoico con un esqueleto  $C_6C_1$  y los derivados del ácido cinámico con un esqueleto  $C_6C_3$  cuya diferencia respecto a los derivados del ácido benzoico radica en una insaturación entre el benceno y el ácido carboxílico o, dicho de otra forma, es un ácido propiónico insaturado unido a un anillo de benceno. El número y posición de los sustituyentes OH o  $OCH_3$  determinara el ácido fenólico (Anantharaju et al. 2016).



**Esquema 1.** Ruta biosintética (resumida) de los ácidos fenólicos más comunes. En azul se muestra el nombre de la enzima que cataliza la reacción. En verde se muestra el grupo funcional añadido y en rojo el grupo funcional saliente. (Dewick, 2009)

**Tabla 2.** Clasificación de ácidos fenólicos según el número, posición y tipo de sustituyentes en el anillo aromático.

		
<b>Sustitución</b>	<b>Derivados de ácido cinámico</b>	<b>Derivados de ácido benzoico</b>
R <sub>2</sub> =OH	<i>O</i> -Cumárico	-
R <sub>4</sub> = OH	<i>p</i> -Cumárico	<i>p</i> -Hidroxibenzoico
R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OH	Cafeico	Protocateico
R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> R <sub>4</sub> = OH	Ferúlico	Vainillinico
R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	-	3,4 Dimetoxibenzoico (Verátrico)
R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>5</sub> = OH	-	Gálico
R <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> , R <sub>5</sub> = OCH <sub>3</sub>	3,4,5 Trimetoxicinámico	
R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub>	-	3-Metoxisalicílico
R <sub>3</sub> , R <sub>5</sub> = OCH <sub>3</sub> R <sub>4</sub> = OH	-	Siringico

## 2.9 Citotoxicidad de ácidos fenólicos y derivados

Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas por lo que al encontrarse en frutos, cereales y vegetales son elementos comunes que forman parte de la dieta, de aquí que sean ampliamente estudiados y a la fecha se les reconozcan propiedades como antioxidantes, citotóxicos, antiinflamatorios, antibacterianos, por mencionar algunos. Por sus numerosas propiedades terapéuticas, los ácidos fenólicos son de gran interés para la investigación, por lo que algunos investigadores toman estos compuestos como base para el diseño de derivados, buscando mejorar la actividad biológica de este tipo de moléculas. (Heleno et al. 2015). Para fines de este trabajo, la información se referirá a los reportes de la actividad anticancerígena de ácidos fenólicos y sus derivados.

Un estudio publicado en 2017 demostró que el ácido cafeico y un derivado esterificado fueron activos contra células de carcinoma de mama MDA-MB-231 con valores CI<sub>50</sub> de 108.42 μM y 55.79 μM respectivamente, a 48 horas de tratamiento (Kabala-Dzik, 2017). El trabajo de Weixia et

al. en 2012, evaluó el potencial citotóxico de dos series de derivados alquil éster de ácido ferúlico y cafeico frente a células de carcinomas humanos, además se analizó la relación estructura-actividad de los compuestos. Como resultado se encontró que los derivados alquil éster del ácido cafeico fueron más activos en comparación con los derivados de ácido ferúlico. En el trabajo realizado por Morin y colaboradores (2017) se evaluó la actividad citotóxica frente a células de glioma (Hs683 y LN319) de dos series de derivados fenetil éster de ácido ferúlico y cafeico. Los resultados demostraron que el derivado fenetil éster de ácido cafeico fue citotóxico, no así el derivado del ácido ferúlico. Además, los derivados fueron mucho más activos en comparación con los ácidos libres cuyas  $CI_{50}$  fueron mayor a 400  $\mu M$  mientras que para los derivados fueron menores de 25  $\mu M$ . Kamatham y colaboradores (2015) aislaron ácido gálico y metil galato de semillas de *Givotia rottleformis*, posteriormente evaluaron dichos compuestos sobre células A431 (carcinoma epidermoidal) obteniendo valores de  $CI_{50}$  de 11  $\mu g/mL$  y 53  $\mu g/mL$  respectivamente. Adicionalmente, estos investigadores evaluaron estos compuestos sobre células de queratinocitos normales sobre los cuales no hubo efectos de citotoxicidad, lo cual demuestra la selectividad de los compuestos. En otro estudio se reportó que el ácido ferúlico tuvo una  $CI_{50}$  de 500  $\mu M/mL$  a 72h sobre células de carcinoma pancreático MIA PaCa-2. Se observó también que el ácido provocó un decremento en la expresión de CDK4/6, Bcl2 y caspasa 8 y 6, por el contrario, la expresión de p53, Bax, PTEN, caspasa 3 y 9 se incrementó (Fahrioglu et al. 2015). En otro estudio, Fiuza y colaboradores estudiaron la actividad citotóxica de derivados metil, propil y octil ésteres relacionados estructuralmente, de ácido gálico y cafeico sobre células de carcinoma cervicouterino (HeLa). El análisis estructura-actividad mostró que la longitud de la cadena está directamente relacionada al grado de actividad siendo los derivados propil (cadena mediana) los más activos. En otra investigación, se reportó que el ácido ferúlico tuvo actividad citotóxica sobre células de osteosarcoma 143B y MG63, adicionalmente se encontró que el ácido indujo arresto en la fase G0/G1 y disminuyó la expresión de proteínas como CDK 2, CDK 4 y CDK 6 e incrementó la expresión de Bax y caspasa 3. En este trabajo también se evaluó el efecto del ácido ferúlico sobre la vía PI3K/Akt cuyo resultado mostró que el compuesto fue capaz de modular la activación de esta vía por lo que los autores proponen al ácido ferúlico como una molécula con potencial para el tratamiento de osteosarcoma (Wang et al. 2016). La actividad citotóxica de ácidos fenólicos ha sido ampliamente estudiada, en diversos artículos de revisión (Anantharaju et al. 2016; Heleno et al. 2015; Lewandovzka, et al. 2016) recopilan numerosos estudios de estos ácidos y sus derivados y su efecto sobre líneas celulares de cáncer, así como los posibles mecanismos moleculares.

### **2.10 Compuestos fenólicos como inhibidores de DNMT**

Dentro de este grupo los productos naturales y en particular los compuestos fenólicos han mostrado resultados prometedores. Una de estas moléculas es epigallocatequin-3-galato o EGCG, un compuesto natural presente en hojas de té verde el cual se ha evaluado en numerosos ensayos como agente citotóxico. Este compuesto demostró actividad DNMTi a través de un mecanismo que sugiere el bloqueo del sitio activo de la enzima. Un compuesto de tipo isoflavona que además de sus propiedades como antitumoral sobre diversos blancos, también se ha evaluado como DNMTi es la genisteína, la cual logró disminuir la metilación de regiones promotoras de genes como p16INK4a y MGMT, actualmente junto con EGCG son considerados inhibidores celulares y enzimáticos de DNMT (Gros et al. 2012). Curcumina, es otro polifenol que mostró actividad sobre

DNMT, específicamente en un modelo de células MV-411 donde redujo la metilación del ADN en un 20% aproximadamente a través de un mecanismo de bloqueo del grupo tiol del sitio catalítico de la enzima. Diversos flavonoides como miricetina, epicatequina y quercetina también mostraron actividad inhibitoria sobre DNMT bloqueando la metilación de manera indirecta a través de la enzima O-catecol-metil-transferasa (COMT). Otros polifenoles presentes en frutas y cereales como ácido cafeico y ácido clorogénico han resultado activos como DNMTi (Medina-Franco & Caulfield, 2011). En un estudio se determinó que estos ácidos son capaces de inhibir la metilación del ADN de manera concentración-dependiente. Se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  de 2.3 y 0.9  $\mu M$  respectivamente, alcanzando porcentajes de inhibición de la metilación de hasta 80%. Este estudio permitió también establecer un posible mecanismo el cual plantea que ocurre una inhibición no competitiva, mediada por el incremento de S-adenosil homocisteína o SAH, un inhibidor de la metilación (Woon & Bao, 2005).

**Tabla 3.** Algunos compuestos fenólicos inhibidores de DNMT (Gros et al. 2012; Won & Bao, 2005)

Compuesto	Efectos	Modelos	Fase de estudio
EGCG	Re-expresión de genes RARb, p16INK4a y MGMT	Líneas celulares de tumores sólidos, estudios <i>in silico</i>	Fase I
Curcumina	Disminuye la metilación global en células MV4-11	Líneas celulares de carcinomas sólidos y hematológicos	Preclínicos
Ácido lacaico	Actividad inhibitoria micromolar sobre DNMT, sinergismo con azacitidina	Línea celular MCF7	Preclínicos
Ácido cafeico	Inhibición <i>in vitro</i> de DNMT1	Ensayos de inhibición enzimática, líneas celulares MCF7 y MAD-MB-231	Preclínicos
Ácido clorogénico	Inhibición <i>in vitro</i> de DNMT1	Ensayos de inhibición enzimática, líneas	Preclínicos



### 3. JUSTIFICACIÓN

---

---

---

La hipermetilación del ADN en regiones promotoras de genes supresores es un evento epigenético asociado al desarrollo de varias patologías como cáncer. La inhibición de enzimas DNMT permite disminuir la metilación del ADN en regiones promotoras, lo que resulta en la re-expresión de genes silenciados en cáncer. Actualmente, hay solo dos moléculas aprobadas como inhibidores de la metilación, por tal motivo, encontrar moléculas con actividad inhibitoria sobre la metilación de ADN es de gran interés. Se ha demostrado el potencial citotóxico de numerosos compuestos fenólicos además de la capacidad de éstos para inhibir enzimas DNMT y así reestablecer los niveles de metilación del ADN. Por lo anterior, los derivados de ácidos fenólicos son moléculas idóneas para evaluar su actividad sobre la metilación del ADN de células cancerosas.

## **4. HIPÓTESIS**

---

---

---

Los derivados de tipo éster y O-metilo de ácidos fenólicos presentan actividad citotóxica e inhibitoria de la metilación del ADN que afectan la supervivencia y estado de metilación del ADN en células de carcinoma hepatocelular.

## 5. OBJETIVOS

---

---

### 5.1 Objetivo general:

Determinar la actividad citotóxica e inhibitoria de la metilación global de ADN en células de carcinoma hepatocelular, de derivados de tipo éster y O-metilo de ácidos fenólicos.

### 5.2 Objetivos específicos:

1. Obtener por semisíntesis los derivados esterificados y O-metilados de los ácidos fenólicos: cafeico, *p*-cumárico, 3,4 dimetoxibenzoico, ferúlico, gálico, 4-hidroxibenzoico, protocateico, 3-metoxisalicílico, 3,4,5 trimetoxicinámico y siríngico.
2. Purificar los compuestos obtenidos por medio de cromatografía en columna.
3. Caracterizar los derivados mediante RMN <sup>1</sup>H.
4. Determinar la actividad citotóxica de los derivados obtenidos en una línea celular de carcinoma hepatocelular Hep3B.
5. Evaluar la selectividad de los compuestos más activos en una línea celular no cancerosa (IHH) de hepatocitos humanos.
6. Analizar la actividad inhibitoria de la metilación del ADN, de los derivados en células de hepatocarcinoma Hep3B.

## **6. MÉTODOS**

---

---

---

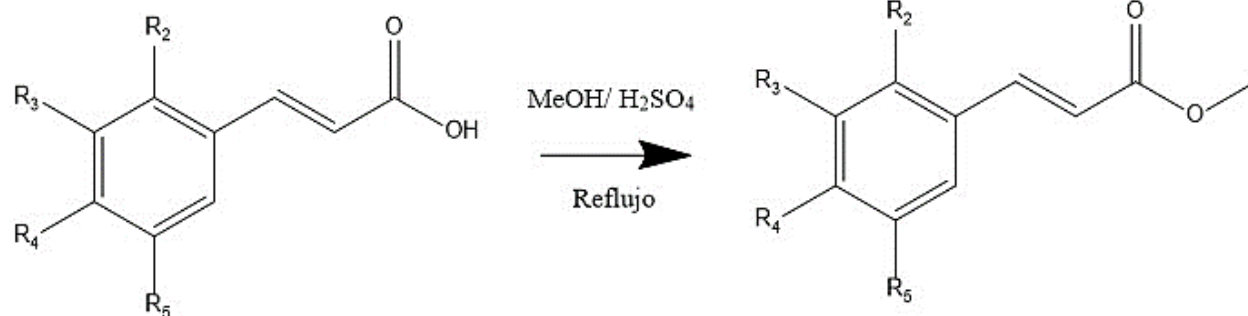
## 6.1 Semisíntesis de derivados

### 6.1.1 Métodos generales

Los derivados se obtuvieron mediante reacciones de alquilación (metilación) de los grupos COOH y OH de los ácidos fenólicos cafeico, *p*-cumárico, 3,4-dimetoxibenzoico, ferúlico, gálico, 4-hidroxibenzoico, protocateico, 3,4,5-trimetoxicinámico, 3-metoxisalicílico y síringico, obtenidos de marcas comerciales. El curso de cada una de las reacciones fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cromatofolios 60 F<sub>254</sub> de Merck®. Se utilizó el estándar de materia prima (ácido fenólico) como referencia. El revelado de las placas se realizó con luz ultravioleta ( $\lambda$  corta 254,  $\lambda$  larga 366 nm) y solución al 1% de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico 2N. La purificación de los derivados obtenidos se llevó a cabo utilizando cromatografías en columna con gel de sílice flash malla 230-400 de Merck®. Los compuestos puros se caracterizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN <sup>1</sup>H 200 MHz) en un equipo Varian Mercury 200 MHz, Versión VNMRJ22D utilizando disolventes deuterados (cloroformo, acetona, metanol, DMSO). El análisis y procesamiento de los espectros se hizo con el software MestReNova. Se determinó el punto de fusión de cada uno de los derivados obtenidos en un fusiómetro marca Prendo. Los datos obtenidos se compararon con lo reportado en la literatura.

### 6.1.2 Metodología general para la semisíntesis de derivados esterificados

La modificación del grupo COOH de los ácidos fenólicos se realizó a través de una reacción de Fisher. Se utilizaron aproximadamente 300 mg del ácido fenólico comercial y se colocaron en un matraz bola de 50 mL provisto con agitador magnético, a continuación, se agregaron 7 mL de metanol y 0.5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Una vez adicionados los reactivos, se colocó un refrigerante en posición vertical y se colocó sobre un baño de aceite a una temperatura de 90°C y agitación constante. La reacción se monitoreó por CCF, una vez transformada toda la materia prima, el producto se extrajo por triplicado con AcOEt. Los extractos se reunieron y se colocaron en un embudo de separación de 60 mL, posteriormente se adicionó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se agitó varias veces y se dejaron separar las fases acuosa y orgánica. Se recolectó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anhidro. Mediante filtración se separó el residuo y el disolvente se eliminó mediante destilación utilizando un equipo de rotaevaporador. El residuo obtenido se colocó en un vial de vidrio previamente pesado y se dejó a temperatura ambiente hasta que se evaporó todo el disolvente. Una vez eliminado todo el disolvente, se pesó el vial nuevamente y se calculó el peso del crudo de reacción obtenido. El residuo absorbido en gel de sílice se colocó en la columna abierta y ésta se eluyó a gravedad con una mezcla de Hex/AcOEt (90:10). Las fracciones obtenidas se monitorearon por CCF con un sistema de elusión Hex/AcOEt/Ac. Fórmico (6:4:0.3). Las fracciones se concentraron con un equipo rotaevaporador y se recuperaron en viales pesados y etiquetados.



Ácido

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>= OH (cafeico)

R<sub>4</sub>= OH (*p*-cumárico)

R<sub>3</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>= OH (ferúlico)

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>= OCH<sub>3</sub> (3,4,5 trimetoxicinámico)

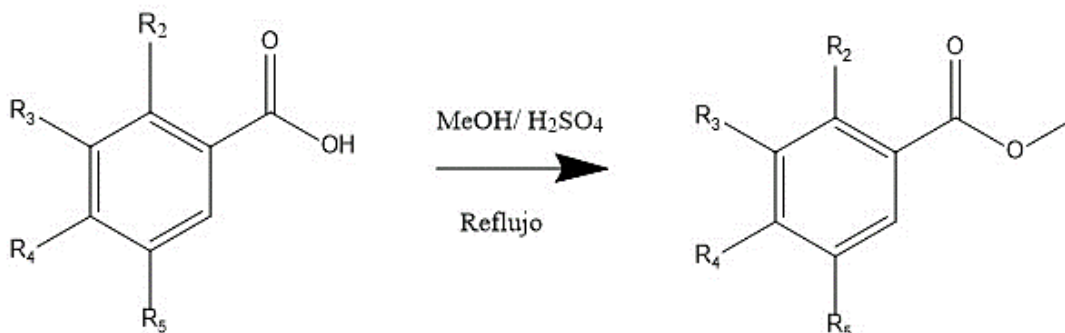
Derivado

3,4-dihidroxicinamatode metilo (1)

4-hidroxicinamato de metilo (2)

4-hidroxi-3-metoxicinamato de metilo (4)

3,4,5-trimetoxicinamato de metilo (13)



Ácido

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>= OCH<sub>3</sub> (3,4- dimetoxibenzoico)

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>= OH (gálico)

R<sub>4</sub>= OH (4-hidroxiibenzoico)

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>= OH (Protocateico)

R<sub>2</sub>= OH R<sub>3</sub>= OCH<sub>3</sub> (3-metoxisalicílico)

R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub>= OH (siringico)

Derivado

3,4 dimetoxibenzoato de metilo (3)

3,4,5-trihidroxiibenzoato de metilo (5)

4-hidroxiibenzoato de metilo (6)

3,4 dihidroxiibenzoato de metilo (7)

3-metoxisalicilato de metilo (12)

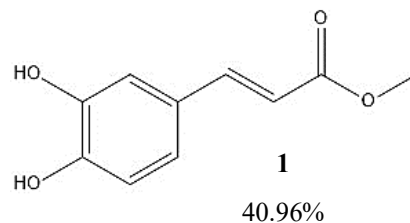
4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato (14)

**Esquema 2.** Reacción de esterificación de Fisher

### 6.1.3 Obtención de derivados esterificados. Condiciones particulares

#### Obtención de (2E)-3-(3,4-dihidroxifenil) prop-2-enoato de metilo o 3,4-dihidroxicinamato de metilo (**1**)

En un matraz bola provisto de agitador magnético se colocaron 307.6 mg de ácido cafeico, posteriormente se siguió el proceso descrito en la sección de métodos generales 6.1.2. El tiempo de reacción fue de 2.5 horas. El derivado se obtuvo como un sólido blanquecino de apariencia cristalina. La estructura de este compuesto fue establecida por el análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H.

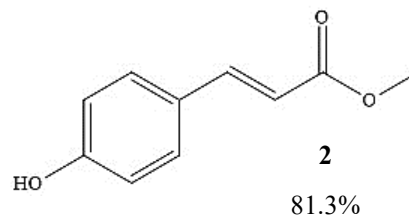


**RMN <sup>1</sup>H:** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$  7.48 (d, *J*= 15.9 Hz, 1H), 7.02 (ddd, *J*= 8.4, 1.9, 0.4 Hz, 2H), 6.76 (dd, *J*= 8.4, 0.5 Hz, 1H), 6.27 (d, *J*= 15.7 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H). **PM:** 194.19. **FM:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>.

Se determinó su **P.F** =155-157 °C.

#### Obtención de (2E)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-enoato de metilo o 4-hidroxicinamato de metilo (**2**)

Siguiendo el procedimiento de la sección 6.1.2 se obtuvo el derivado **2**. En un matraz bola se colocaron 310 mg de ácido cumárico. La reacción tuvo una duración de 3 horas. El derivado se obtuvo como un sólido amarillento de aspecto cristalino. La estructura del compuesto se estableció mediante el análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H.

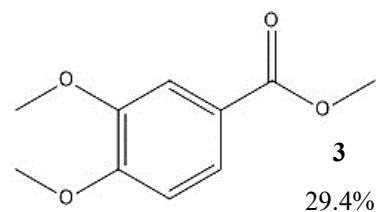


**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  7.64 (d, *J*= 16.0 Hz, 1H), 7.42 (ddd, *J*= 8.0, 1.7, 0.4 Hz, 2H), 6.85 (ddd, *J*= 8.0, 1.6, 0.4 Hz, 2H), 6.30 (d, *J*= 16.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H). **PM:** 178.19. **FM:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

Se determinó su **P.F** = 135-137°C.

#### Obtención de 3,4 dimetoxibenzoato de metilo o veratrato de metilo (**3**)

Se colocaron 300 mg del ácido 3,4 dimetoxibenzoico en un matraz para obtener el derivado **3** siguiendo la metodología del apartado 6.1.2. El tiempo de reacción fue 23 horas. Como producto se obtuvo un sólido de color blanco y apariencia de polvo. El análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H permitió establecer su estructura.

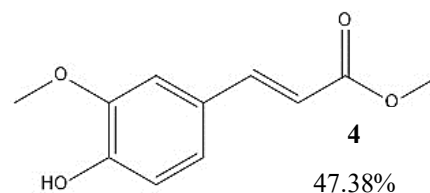


**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  7.70 (dd, *J*= 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J*= 1.6, 0.4 Hz, 1H), 7.54 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 6.89 (d, *J*= 0.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H). **PM:** 196.20. **FM:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

Se determinó su **P.F.**= 131-134 °C.

*Obtención de (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-enoato de metilo o 4-hidroxi-3-metoxicinamato de metilo (4)*

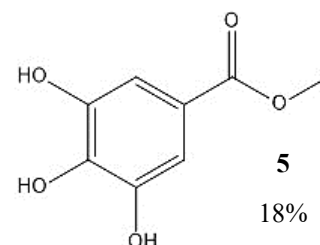
Con la metodología descrita en la sección 6.1.2 se obtuvo el derivado **4** (ferulato de metilo) colocando 322 mg de ácido ferúlico en un matraz. La reacción tuvo una duración de 3 horas. El producto se obtuvo como un polvo color blanco. La estructura del compuesto se estableció mediante el análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H.



**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.62 (d, *J*= 15.9 Hz, 1H), 7.10- 7.01 (m, 2H), 6.91 (d, *J*= 8.1 Hz, 1H), 6.29 (d, *J*= 15.9 Hz, 2H), 5.89 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.79 (s, 3H). **PM**: 208.21 **FM**: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>  
Se determinó el **P.F** 59-61 °C.

*Obtención de 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo o galato de metilo (5)*

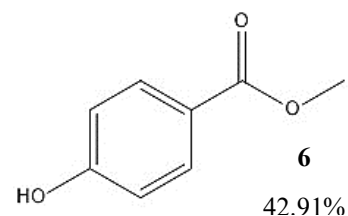
En un matraz se colocaron 340 mg de ácido gálico, con la metodología descrita en la sección de métodos generales y un tiempo de reacción de 2.5 horas se obtuvo el derivado **5** con apariencia de un polvo amarillento. El análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H permitió establecer su estructura.



**RMN <sup>1</sup>H** (Metanol-*d*<sub>4</sub>, 200 MHz) δ 7.04 (d, *J*= 2.7 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H). **PM**: 184.15. **FM**: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub> Se determinó el **P.F.**= 191-193 °C.

*Obtención de 4- hidroxibenzoato de metilo o metilparabeno (6)*

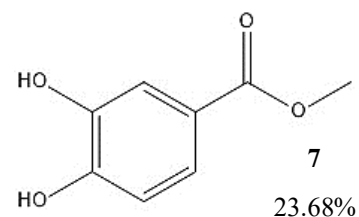
Como se ha descrito en la sección 6.1.2, la síntesis del derivado **6** se realizó siguiendo esta metodología. Se colocaron 302 mg de ácido 4-hidroxibenzoico en un matraz, la reacción tuvo una duración de 3 horas. El producto se obtuvo como un polvo blanco. Su estructura se estableció del análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H.



**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.95 (ddd, *J*= 8.6, 1.4, 0.4 Hz, 2H), 6.88 (ddd, *J*= 8.6, 1.1, 0.4 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H). **PM**:152.15. **FM**: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> Se determinó el **P.F.**= 54-55 °C.

*Obtención de 3,4-dihidroxibenzoato de metilo (7)*

El producto fue obtenido siguiendo el mismo procedimiento del apartado 6.1.2 con un tiempo de reacción de 3.3 horas. El derivado fue un sólido amarillento cristalino. Su estructura se estableció por el espectro de RMN <sup>1</sup>H. **RMN <sup>1</sup>H** (Acetona-*d*<sub>6</sub>, 200 MHz) δ 7.47 (dd, *J*= 8.3, 1.6 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J*= 1.6, 0.5 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J*= 8.3, 0.5 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H). **PM**: 168.15. **FM**: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> Se determinó el **P.F.**= 120-122 °C.



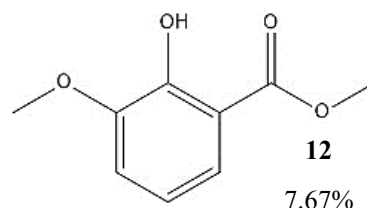


*\*Obtención de 2-hidroxi-3-metoxibenzoato de metilo o 3-metoxisalicilato de metilo (12)*

En un matraz se colocaron 314 mg de ácido 3-metoxisalicílico, siguiendo la metodología del apartado 6.1.2 después de 5 horas de reacción se obtuvo un producto sólido blanco. El análisis de su espectro de RMN <sup>1</sup>H permitió establecer la estructura.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.43 (dd, *J*= 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J*= 8.5 Hz, 3H), 6.82 (dd, *J*= 8.5, 1.4 Hz, 1H), 5.29 (s, OH), 3.96 (s, 3H), 3.90 (s, 3H). **PM:** 182.18. **FM:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

Se determinó el **P.F.**= 55-58 °C.

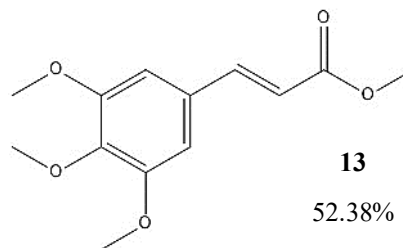


*\*Obtención de (2E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-enoato de metilo o 3,4,5 trimetoxicinamato de metilo (13)*

El derivado **13** se sintetizó a partir de 319.2 mg de ácido 3,4,5 trimetoxicinámico siguiendo la metodología de la sección 6.1.2 con un tiempo total de reacción de 2 horas. El producto final recuperado fue un sólido cristalino incoloro. El análisis espectro de RMN <sup>1</sup>H determinó la estructura.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.61 (d, *J*=15.9 Hz, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.34 (d, *J*=15.9, 1H), 3.89 (s, 9H), 3.80 (s, 3H). **PM:** 252.27. **FM:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>

Se determinó el **P.F.**= 89-92 °C.

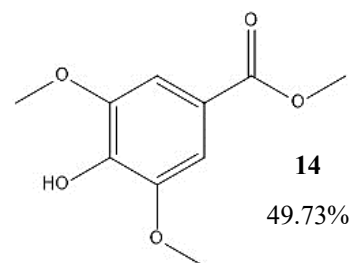


*\*Obtención de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato de metilo o siringato de metilo (14)*

Con la metodología de la sección 6.1.2 se sintetizó el compuesto **14** a partir de 300mg de ácido siringico con un tiempo de reacción de 5 horas. Como producto se obtuvo un sólido amarillento de apariencia cristalina. El análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H determine la estructura.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.32 (s, 2H), 5.91 (s, 1H), 3.94 (s, 6H), 3.90 (s, 3H). **PM:** 212.20. **FM:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

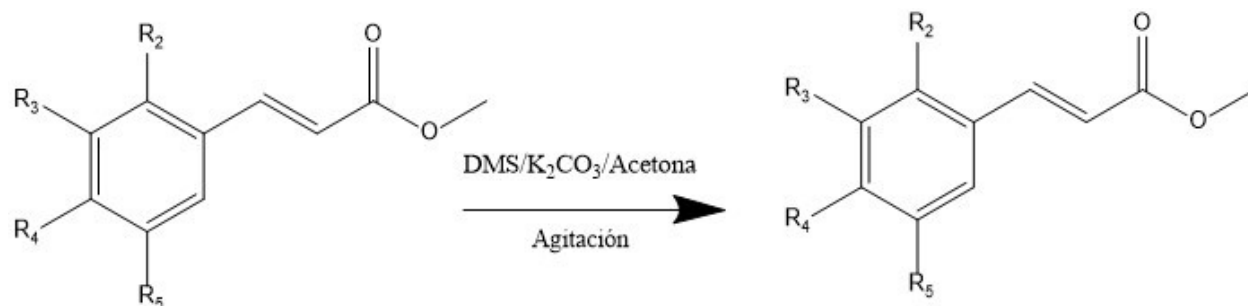
Se determinó el **P.F.**= 100-103 °C.



\* Los derivados 12, 13 y 14 fueron sintetizados bajo mi supervisión por la alumna de bachillerato Magdalena Velázquez Curiel para su trabajo de tesina titulado: SEMISÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ANÁLOGOS DE ÁCIDOS CINÁMICO Y BENZOICO.

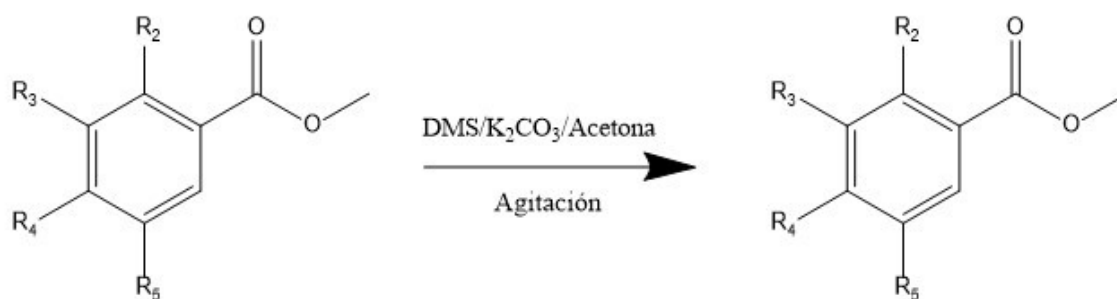
#### 6.1.4 Metodología general para la semisíntesis de derivados O-metilados

Para obtener los derivados O-metilados se utilizó como materia prima: cumarato de metilo (**2**), ferulato de metilo (**4**), galato de metilo (**5**) y 4-hidroxibenzoato de metilo (**6**). Para la reacción de alquilación (metilación en los grupos OH) se utilizó DMS (dimetilsulfato) como reactivo alquilante. En un matraz bola de 50 mL provisto de agitador magnético, se colocaron entre 50 y 100 mg de la materia prima, 6 equivalentes de  $K_2CO_3$  y acetona como disolvente. El matraz se colocó en la parrilla de agitación con un baño de aceite a 45°C y se conectó a un recirculador para crear las condiciones de reflujo. La reacción se mantuvo durante una hora y se monitoreó por CCF utilizando la materia prima como referencia. Una vez terminada la reacción el producto se extrajo por filtración del crudo de reacción, el residuo sólido se lavó por triplicado con acetona. La fase líquida de los lavados se recuperó en un matraz bola y se eliminó el exceso de disolvente mediante presión reducida con un equipo rotaevaporador. El producto se recuperó en un vial limpio previamente pesado y se dejó secar a temperatura ambiente hasta evaporar todo el disolvente. Una vez seco, se pesó nuevamente y se calculó el peso del crudo de reacción obtenido. El residuo adsorbido en gel de sílice se colocó en la columna abierta y ésta se eluyó a gravedad con una mezcla de Hex/AcOEt (90:10). Las fracciones se monitorearon por CCF con un sistema Hex/AcOEt/A. Fórmico (6:4:0.3). Las fracciones se concentraron con un equipo rotavapor y se recuperaron en viales pesados y etiquetados.



Éster  
 4-hidroxicinamato de metilo (2)  
 4-hidroxi-3-metoxicinamato de metilo (4)

Derivado O-metilado  
 $R_4 = \text{OCH}_3$  4-metoxicinamato de metilo (8)  
 $R_3, R_4 = \text{OCH}_3$  3,4-dimetoxicinamato de metilo (9)



Éster  
 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (5)  
 4-hidroxibenzoato de metilo (6)

Derivado O-metilado  
 $R_3, R_4, R_5 = \text{OCH}_3$  3,4,5-trimetoxibenzoato de metilo (10)  
 $R_4 = 4\text{-metoxibenzoato de metilo}$  (11)

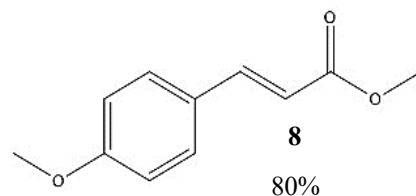
**Esquema 3.** Reacción de metilación con DMS para obtener derivados O-metilados.

### 6.1.5 Obtención de los derivados O-metilados. Condiciones particulares

#### Obtención de (2E)-3-(4-metoxifenil) prop-2-enoato de metilo o 4-metoxicinamato de metilo (**8**)

En un matraz se colocaron 50.6 mg de cumarato de metilo (**2**), siguiendo la metodología de la sección 6.1.4 se obtuvo un sólido amarillento de aspecto cristalino. La estructura de este compuesto fue establecida por el análisis del espectro obtenido por RMN <sup>1</sup>H.

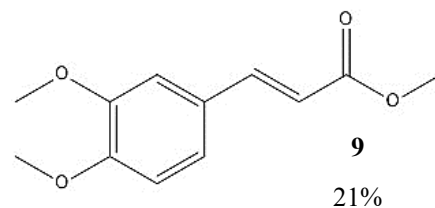
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.66 (d, *J*= 16 Hz, 1H), 7.48 (ddd, *J*= 8.8, 1.7, 0.5 Hz, 2H), 6.91 (ddd, *J*= 8.8, 1.2, 0.5 Hz, 2H), 6.31 (d, *J*= 16.1 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H). **PM**:192.21. **FM**: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> **P.F.**= 77-80 °C.



#### Obtención de (2E)-3-(3,4-dimetoxifenil) prop-2-enoato de metilo o 3,4 dimetoxicinamato de metilo (**9**)

El derivado **9** se obtuvo a partir de 130 mg de ferulato de metilo (**4**) siguiendo la metodología descrita en 6.1.4. El producto final fue un polvo blanco. La estructura de este compuesto se estableció por el análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H.

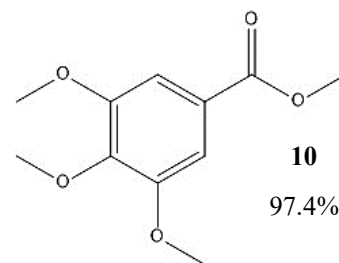
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.64 (d, *J*= 15.9 Hz, 1H), 7.09 (ddd, *J*= 8.4, 1.9, 0.4 Hz, 2H), 6.86 (dd, *J*= 8.2, 0.4 Hz, 1H), 6.31 (d, *J*= 16.0 Hz, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.80 (s, 3H). **PM**. 222.24. **FM**: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> **P.F.**= 60-63 °C.



#### Obtención de 3,4,5 trimetoxibenzoato de metilo (**10**)

Siguiendo la metodología del apartado 6.1.4 en un matraz se pesaron 54.3 mg de galato de metilo (**5**). Como producto se obtuvo un sólido cristalino incoloro. La estructura del compuesto fue determinada mediante el análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H.

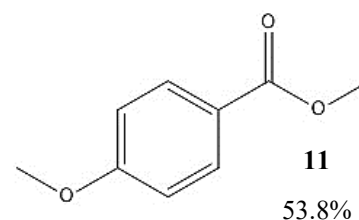
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.30 (d, *J*= 2.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 12H). **PM**: 226.23 **FM**: C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> **P.F.**= 76-78 °C.



#### Obtención de 4-metoxibenzoato de metilo o p-anisato de metilo (**11**)

Con el proceso descrito en la sección 6.1.4 se sintetizó el derivado **11** a partir de 68.2 mg de parabeno de metilo (**6**). Como producto final se obtuvo un sólido amarillento. El análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H permitió establecer la estructura. **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ 7.99 (ddd, *J*= 8.6, 1.4, 0.5 Hz, 2H), 6.92 (ddd, *J*= 8.6, 1.2, 0.5 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H).

**PM**: 166.18. **FM**: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> **P.F.**= 47-49 °C



## 6.2 Evaluaciones biológicas de derivados obtenidos

### 6.2.1 Cultivo celular

Las células de carcinoma Hep3B (ATCC) o hepatocitos inmortalizados IHH (Basu et al. 2006) se sembraron en un frasco de cultivo con medio EMEM (Gibco®) suplementado con SFB al 10%, aminoácidos no esenciales y L-glutamina. Se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Para sembrar en placas de 96 pozos, las células se trataron con 1mL de tripsina para desprender la monocapa. Posteriormente se adicionaron 2mL de medio de cultivo fresco y el volumen total se centrifugó a 10000 rpm durante tres minutos. Se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 3 mL de medio de cultivo fresco. Se tomó una alícuota de esta suspensión celular y se realizó el conteo en cámara de Neubauer con el método de azul de tripano. Una vez realizados los cálculos se procedió a sembrar las células en las placas a una densidad de  $6 \times 10^3$  en 100  $\mu$ L de medio suplementado por pozo y se incubaron por 18 h bajo las mismas condiciones.

### 6.2.2 Ensayo de MTS en células Hep3B e IHH

Después de incubar las células en placas de 96 pozos durante 18 horas, se retiró el medio de cultivo y se aplicaron los tratamientos con los derivados obtenidos a las concentraciones crecientes: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu$ g/mL (a excepción del compuesto 1 cuya concentración mayor fue de 50  $\mu$ g/mL) en 100  $\mu$ L de medio de cultivo fresco. Se utilizó DMSO al 0.05% como control negativo y taxol como control positivo. Luego de 72 horas se retiró el medio de cultivo y se realizaron tres lavados con PBS 1X para eliminar el excedente de tratamientos. A continuación, se adicionaron 100  $\mu$ L de medio fresco + 20  $\mu$ L de reactivo MTS (CellTiter96® Aqueous One Solution Reagent, Promega) por pozo. Las placas se dejaron incubar en la oscuridad dos horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Enseguida se hizo la lectura de las absorbancias con un lector de placas a longitud de onda de 450 nm. Los datos obtenidos se procesaron con el software Excel y Prisma 5.0. Para las células IHH se realizó el protocolo anterior con algunas modificaciones, en este caso se evaluaron solo los compuestos citotóxicos ( $CI_{50} < 100$   $\mu$ g/mL) a una única concentración de 80  $\mu$ g/mL, concentración a la cual se encuentra el máximo valor de  $CI_{50}$  determinado en células Hep3B.

### 6.2.3 Determinación del nivel de metilación del ADN

#### a) Cultivo celular y tratamientos

Las células Hep3B se sembraron en placas de seis pozos a una densidad de  $2 \times 10^6$  y se incubaron por 18 h a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se aplicaron los tratamientos, es decir, los derivados **1, 2, 3, 4, 8, 9, 11 y 13** así como los ácidos cafeico y gálico a la  $CI_{50}$  determinada en el ensayo de MTS. Las células se incubaron a las condiciones ya mencionadas durante 72 h.

#### b) Extracción de ADN

Luego de las 72 h de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se procedió a extraer el ADN de las células tratadas con el kit AquaPure Genomics DNA Kits de BioRad®. Siguiendo el protocolo del fabricante (Sección 11.2 de anexos), se llevó a cabo la lisis celular, precipitación de proteínas

y finalmente la obtención del ADN genómico por una precipitación con etanol en una solución estabilizadora. La cuantificación de ADN se realizó en un equipo NanoDrop 2000 de ThermoScientific.

c) Determinación de la metilación del ADN

Para determinar la actividad de los compuestos sobre la metilación global del ADN se utilizó el kit MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) de Epigentek. Este kit permite la cuantificación global de metilación del ADN a través de un método colorimétrico donde la concentración de ADN metilado es proporcional a la intensidad de la absorbancia. El porcentaje de metilación del ADN extraído de las células tratadas fue evaluado con este kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Sección 11.3 de anexos). Brevemente, el ADN se coloca en los pozos de la placa (incluida en el kit) los cuales están tratados especialmente para tener una alta afinidad por el ADN. Posteriormente, la fracción de ADN metilado se detecta por medio de la aplicación e incubación con anticuerpos de captura y detección los cuales generan una coloración que se mide en un lector de absorbancia cuya intensidad es proporcional a la cantidad de ADN metilado.

## **7. RESULTADOS**

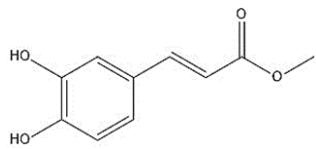

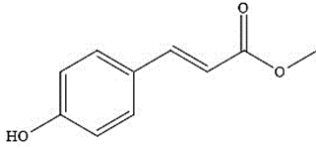

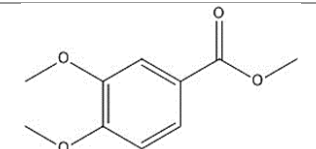
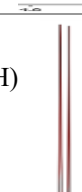
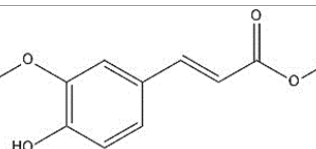

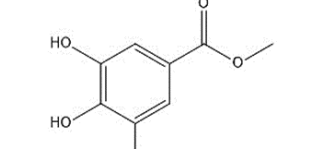



## 7.1 Obtención de derivados

### 7.1.1 Derivados ésteres

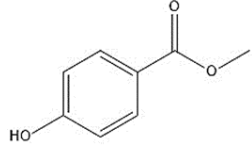

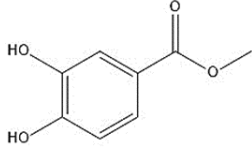

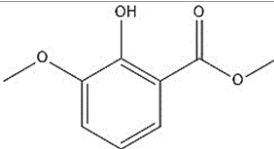

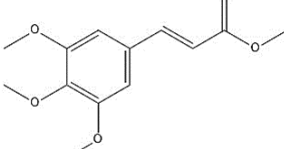

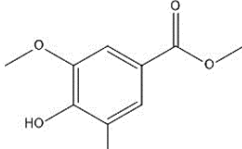

Una vez terminada la reacción, se procedió a purificar los compuestos por cromatografía en columna y posteriormente se hizo su caracterización mediante RMN <sup>1</sup>H. En la tabla siguiente se muestra el punto de fusión, rendimiento, estructura y señales características en RMN <sup>1</sup>H de los derivados esterificados.

**Tabla 4:** Derivados esterificados, algunas características y señal principal en RMN <sup>1</sup>H.

Clave de derivado y nombre común	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)	Estructura	Señal característica del O-Me del éster en RMN <sup>1</sup> H (δ ppm)
<b>1</b> Cafeato de metilo	155-157	40.96		3.68 (s, 3H) 
<b>2</b> Cumarato de metilo	135-137	81.3%		3.80 (s, 3H) 
<b>3</b> Veratrato de metilo	131-134	29.4		3.89 (s, 3H) 
<b>4</b> Ferulato de metilo	59-61	47.38		3.79 (s, 3H) 
<b>5</b> Galato de metilo	191-193	18		3.81 (s, 3H) 

Continúa



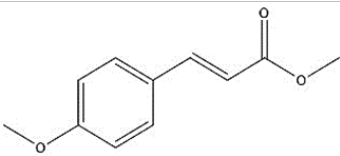

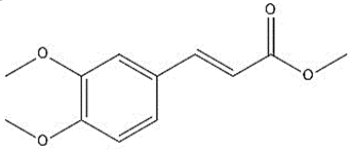

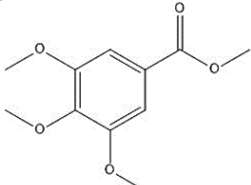

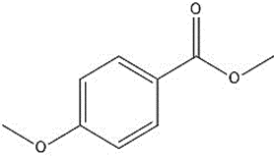

<b>6</b> Parabeno de metilo	54-55	42.91		3.89 (s, 3H) 
<b>7</b> 3, 4- dihidroxibenzoato de metilo	120-122	23.68		3.80 (s, 3H) 
<b>12</b> 3-metoxisalicilato de metilo	55-58	7.67		3.90 (s, 3H) 
<b>13</b> 3,4, 5- trimetoxicinamato de metilo	89-92	52.38		3.80 (s, 3H) 
<b>14</b> Siringato de metilo	100-103	49.73		3.90 (s, 3H) 

$\delta$  (ppm), multiplicidad e integración.

### 7.1.2 Derivados O-metilados

Una vez terminada la reacción se realizó la purificación de los compuestos mediante cromatografía en columna para posteriormente caracterizarlos por RMN  $^1\text{H}$ . La siguiente tabla muestra el punto de fusión, rendimiento y señales características en RMN de los derivados O-metilo.

**Tabla 5.** Derivados O-metilados, algunas características y señal principal en RMN  $^1\text{H}$ .

Clave de derivado y nombre común	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)	Estructura	Señales características <u>OMe del éster y de sustituyentes OH en RMN <math>^1\text{H}</math> (<math>\delta</math> ppm)</u>
<b>8</b> 4-metoxicinamato de metilo	77-80	80		3.84 (s, 3H) <u>3.79 (s, 3H)</u> 
<b>9</b> 3,4-dimetoxicinamato de metilo	60-63	21		3.91 (s, 6H) <u>3.80 (s, 3H)</u> 
<b>10</b> 3,4,5-trimetoxibenzoato de metilo	76-78	97.4		<u>3.90 (s, 12H)</u> 
<b>11</b> 4-metoxibenzoato de metilo	47-49	53.8		3.88 (s, 3H) <u>3.86 (s, 3H)</u> 

El texto subrayado representa la señal correspondiente al OMe del éster.

$\delta$  (ppm), multiplicidad e integración.

## 7.2 Actividad citotóxica de derivados

### 7.2.1 Actividad citotóxica de derivados ésteres

Se evaluó la actividad citotóxica de los derivados esterificados (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13 y 14**) en una línea celular de carcinoma hepático Hep3B mediante el método de MTS, posteriormente, para conocer la selectividad de los compuestos activos, éstos se evaluaron en una línea no cancerosa de hepatocitos humanos (IHH). En la tabla 6 se observa que los derivados **5, 6, 7, 12 y 14** no fueron citotóxicos ya que su  $CI_{50}$  fue mayor a  $100 \mu\text{g/mL}$ , por el contrario, los compuestos más citotóxicos en células cancerosas fueron los derivados **1 y 2**.

**Tabla 6.** Concentraciones inhibitorias medias de derivados esterificados en células cancerosas (Hep3B) y no cancerosas (IHH) e índice de selectividad.

Clave de derivado	Nombre común	$CI_{50}$ en células Hep3B ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{50}$ en células IHH ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS
<b>1</b>	Cafeato de metilo	$21.3 \pm 0.8$	$63.2 \pm 0.85$	2.9
<b>2</b>	Cumarato de metilo	$36.8 \pm 1.3$	$70 \pm 0.58$	1.9
<b>3</b>	Veratrato de metilo	$82.4 \pm 0.6$	-	-
<b>4</b>	Ferulato de metilo	$54.3 \pm 1.0$	$141.7 \pm 4.67$	2.6
<b>5</b>	Galato de metilo	>100	NE	-
<b>6</b>	Parabeno de metilo	>100	NE	-
<b>7</b>	3, 4-dihidroxibenzoato de metilo	>100	NE	-
<b>12</b>	3-metoxisalicilato de metilo	>100	NE	-
<b>13</b>	3,4,5-trimetoxicinamato de metilo	$50 \pm 2.7$	$202.8 \pm 0.59$	4
<b>14</b>	Siringato de metilo	>100	NE	-
	Ácido cafeico	>100	NE	-
	Ácido gálico	70	NE	-

NE= No evaluado

Se muestra el valor de  $CI_{50}$  para cada molécula como la media de tres repeticiones independientes, se muestra también la desviación estándar.

### 7.2.2 Actividad citotóxica de derivados O-metilados

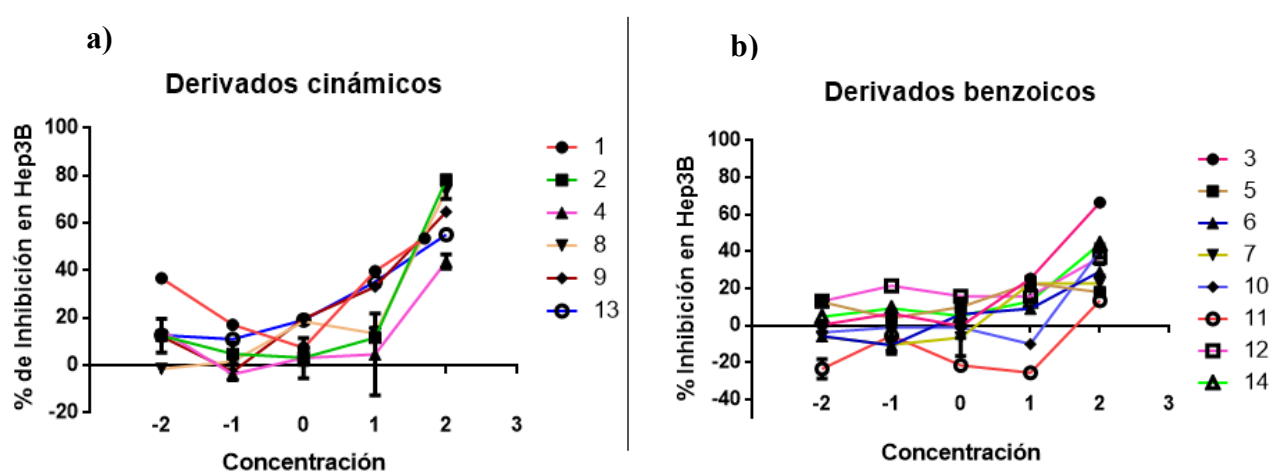
Los derivados O-metilados (**8**, **9**, **10** y **11**) se evaluaron frente a las mismas líneas celulares, una cancerosa (Hep3B) y una no cancerosa (IHH), asimismo se determinó el índice de selectividad de los compuestos citotóxicos. En la tabla 7 se observa que los derivados **10** y **11** no fueron citotóxicos ya que su  $IC_{50}$  fue mayor a 100  $\mu\text{g/mL}$  mientras que el compuesto **9** fue el más citotóxico.

**Tabla 7.** Concentraciones inhibitorias medias de derivados O-metilados en células cancerosas (Hep3B) y no cancerosas (IHH) e índice de selectividad.

Clave de derivado	Nombre común	$CI_{50}$ en células Hep3B ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{50}$ en células IHH ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS
<b>8</b>	4-metoxicinamato de metilo	$70 \pm 1.6$	$826.4 \pm 2.00$	11.8
<b>9</b>	3,4-dimetoxicinamato de metilo	$48.8 \pm 1.2$	$228.2 \pm 1.31$	4.7
<b>10</b>	3,4,5-trimetoxibenzoato de metilo	>100	NE	-
<b>11</b>	4-metoxibenzoato de metilo	>100	>100	-
	Ácido cafeico	>100	NE	-
	Ácido gálico	70	NE	-

\*NE= No evaluado

Se muestra el valor de  $CI_{50}$  para cada molécula como la media de tres repeticiones independientes, se muestra también la desviación estándar.



**Figura 4.** a) Derivados de tipo cinámico y su porcentaje de inhibición en células Hep3B a cada concentración (convertida a logaritmo). b) Derivados de tipo benzoico y su porcentaje de inhibición en células Hep3B a cada concentración (convertida a logaritmo).

### 7.3 Determinación del nivel de metilación del ADN

Se evaluó el efecto de la  $CI_{50}$  en células Hep3B, de los derivados **1, 2, 3, 4, 8, 9, 13** y **11** así como los ácidos cafeico y gálico sobre la metilación global de células Hep3B. Como se observa en la tabla 8, los compuestos más activos fueron **8, 9** y **13** ya que inhibieron más del 90% la metilación del ADN, este efecto podría asociarse a una posible desmetilación de promotores de genes supresores tumorales silenciados. El derivado **4** fue el menos activo, con una inhibición de la metilación de 63.08% sin embargo, se considera buen inhibidor de la metilación del ADN.

**Tabla 8.** Efecto de los derivados obtenidos y ácidos libres en la metilación global de células de carcinoma hepático Hep3B.

Molécula	Porcentaje de metilación global	Porcentaje de inhibición de metilación
<b>DMSO (Basal)</b>	2.5 ± 0.348	0
<b>1</b>	0.788 ± 0.348	68.48
<b>2</b>	0.424 ± 0.186	83.04
<b>3</b>	0.645 ± 0.006	74.2
<b>4</b>	0.923 ± 0.048	63.08
<b>8</b>	0.070 ± 0.067	97.02
<b>9</b>	0.178 ± 0.103	92.88
<b>11</b>	0.364 ± 0.064	85.44
<b>13</b>	0.077 ± 0.057	96.92
<b>Ácido cafeico</b>	1.503 ± 0.117	39.88
<b>Ácido gálico</b>	0.438 ± 0.031	82.48

Se muestra el porcentaje de metilación como la media de tres repeticiones independientes, se muestra también la desviación estándar.

Tomando como control negativo las células Hep3B tratadas únicamente con el vehículo DMSO se obtuvo que la metilación global basal de estas células fue de 2.5%, considerando esta proporción de metilación como 100% se calcularon los porcentajes de inhibición de las moléculas.

### 7.4 Análisis global de las actividades evaluadas de cada derivado

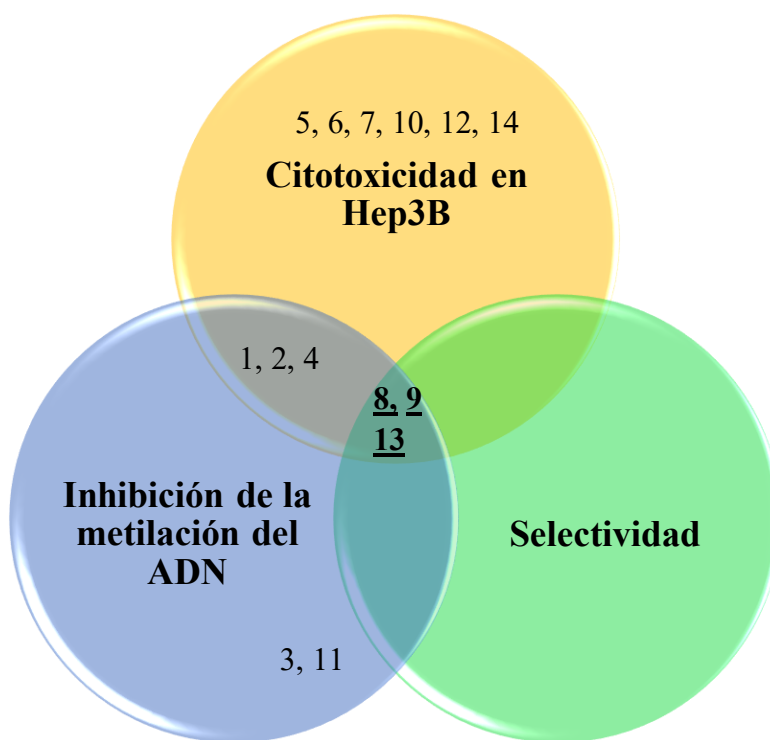
Una vez evaluada la citotoxicidad de las catorce moléculas obtenidas y posteriormente evaluada la selectividad y actividad sobre la inhibición de la metilación del ADN de los derivados **1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11** y **13** se realizó un análisis en conjunto del tipo y grado de actividad de cada compuesto para clasificarlos en diversos grupos y conocer a los mejores candidatos. Los compuestos **8, 9** y **13**, al ser citotóxicos, selectivos y tener una inhibición de la metilación mayor a 90% se consideran los mejores candidatos.

**Tabla 9.** Tipo y grado de actividad de los derivados.

Se muestra el grado de actividad citotóxica, inhibitoria de la metilación e índice de selectividad.  
Simbología:

+++ = Muy activo    ++ = Medianamente activo    + = Poco activo    - = No activo    ND= No determinado

Derivado	Citotoxicidad en Hep3B	IS Selectividad	Inhibición de la metilación
<b>1</b>	+++	+	+
<b>2</b>	+++	+	++
<b>3</b>	+	ND	+
<b>4</b>	++	+	+
<b>8</b>	+	+++	+++
<b>9</b>	++	++	+++
<b>11</b>	-	ND	++
<b>13</b>	++	++	+++



**Figura 5:** Diagrama de Venn que clasifica a cada uno de los derivados obtenidos en distintos grupos según la actividad que hayan presentado. Al centro se ubican los mejores candidatos (**8, 9 y 13**), es decir aquellos que fueron citotóxicos, selectivos e inhibidores de la metilación del ADN.

## 8. DISCUSIÓN

---

---

El cáncer es un grave problema de salud que cobra la vida a millones cada año. A pesar de los avances en la medicina, a la fecha no existe una cura, pues los casos de éxito son escasos, por lo tanto, el descubrimiento y desarrollo de moléculas con actividad anticancerígena es prioritario para la investigación (OMS, 2018). En las últimas décadas, una rama de la genética: la epigenética, ha cobrado importancia para los investigadores ya que se ha demostrado que alteraciones de tipo epigenético conllevan el desarrollo de diversas patologías como el cáncer, de aquí que en la actualidad el estudio de los eventos epigenéticos y la búsqueda de moléculas que actúen sobre este tipo de blancos moleculares se encuentra en auge (Delgado-Coello, 2011).

La metilación del ADN es el evento epigenético más estudiado. Se sabe que algunos tipos de cáncer como de colon, de mama, hepático y diversos tipos de leucemia están relacionados a alteraciones en los niveles de metilación del ADN (Esteller, 2003), por lo tanto, existe una gran variedad y cantidad de moléculas que se encuentran en estudio como inhibidores de la metilación. Dentro de esa gran variedad de moléculas, destacan los compuestos fenólicos por haber mostrado actividad inhibitoria *in vitro*, sinergismo en combinación con fármacos ya aprobados, entre otras actividades (Medina-Franco & Caulfield, 2011).

Con estos antecedentes, en este trabajo se sintetizaron derivados de tipo éster y O-metilo de ácidos fenólicos cinámicos (**1, 2, 4, 8, 9, 13**) y benzoicos (**3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14**). Se obtuvieron catorce derivados que después de su purificación por cromatografía en columna, se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear de protón. Debido a que todos los derivados sintetizados en este trabajo son derivados de ácidos fenólicos, comparten una estructura base como lo es el anillo aromático, por lo tanto, los espectros de resonancia de los derivados de tipo éster (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13 y 14**) y O-metilo (**8, 9, 10 y 11**) tienen en común señales en la región aromática entre 6 y 8 ppm correspondientes a los protones unidos al anillo aromático.

Los ácidos fenólicos de los cuales se obtuvieron los derivados fueron de origen cinámico (**1, 2, 4, 8, 9, 13**) con un esqueleto C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> o de origen benzoico (**3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14**) con un esqueleto C<sub>6</sub>C<sub>1</sub>. Con respecto a los de tipo cinámico, en los espectros de RMN <sup>1</sup>H aproximadamente en 6 y 7.5 ppm se observan dos señales de multiplicidad doble que corresponden a los protones con hibridación sp<sup>2</sup> del doble enlace α y β al carbonilo, además estas señales tienen una constante de acoplamiento de *J*= 15.9 Hz lo que indica se trata de protones en posición *trans*.

El número y multiplicidad de estas señales depende del sistema de espines del anillo aromático, es decir, del número y posición de los sustituyentes en el anillo, por ejemplo, para el caso del derivado **5** o galato de metilo, el cual tiene tres sustituyentes OH en las posiciones 3,4 y 5, se observa en la región aromática de su espectro (Sección 11: Anexos. Espectro 5) una única señal de singulete a 7.04 ppm correspondiente a los protones unidos a los carbonos 2 y 6 del anillo, esta señal que corresponde a dos protones se observa en este caso, como una señal simple debido a que esta molécula es simétrica. Para el caso del derivado **6** (Sección 11: Anexos. Espectro 6) el cual tiene un único sustituyente OH en el anillo en la posición para al carbonilo, se puede observar simetría

en el anillo con sistema de espines  $A_2X_2$ , a 7.95 ppm resuenan los 2 y 6 con una señal doble (2H) con una  $J_0 = 8.6$  Hz y una señal doble a 6.88 ppm (2H)  $J_0 = 9.0$  Hz que corresponde a los otros dos protones aromáticos en posición 3 y 5. En el caso de un anillo aromático 1,3,4 tri-sustituido como el derivado **7** (Sección 11: Anexos. Espectro 7), presenta un sistema de espines ABX, hay tres señales en la región aromática del espectro  $^1H$ ; una señal dd a 7.47 ppm con  $J_0 = 8.3$  Hz que corresponde al protón en posición 6, una señal a 7.41 ppm correspondiente al protón en posición 2 y una señal doble a 6.90 ppm  $J_0 = 8.3$  Hz para el protón unido al carbono 5.

Las señales descritas en los espectros hasta ahora, correspondientes al anillo aromático y al doble enlace, son comunes en la mayoría de los compuestos sintetizados ya que son análogos, sin embargo, la presencia de dos señales en particular permitió la caracterización completa de cada molécula. Estas señales corresponden al grupo metilo que sustituye a un hidrógeno en el ácido carboxílico para formar el respectivo éster, así como las señales correspondientes a grupos metilos que sustituyen a los grupos OH del anillo aromático en la serie de derivados tipo O-metilo. Como ejemplo, el derivado **2** (Sección 11: Anexos. Espectro 2) o éster de ácido cumárico también llamado cumarato de metilo, en su espectro se observa en la región alifática una señal simple e intensa a 3.8 ppm que integra para tres protones, ésta es la señal correspondiente al grupo metilo del éster y se confirma así la identidad de la molécula. En el caso del derivado **8** (Sección 11: Anexos. Espectro 8), el derivado O-metilado del cumarato de metilo, se distinguen dos señales intensas en la región alifática, específicamente en 3.84 y 3.79 ppm que integran para tres protones cada una y que corresponden a los grupos metilo del éster y el O-metilo en posición 4 del anillo, corroborando la identidad del compuesto. Para los derivados de tipo benzoico como la molécula **6** ocurre lo mismo, es decir, en la serie de derivados esteres hay una señal intensa en la región alifática que integra para tres protones y que por ende indica la presencia de un grupo metilo que corresponde al éster. En contraparte, el derivado **11** que pertenece a la serie de los derivados tipo O-metilo, se distinguen dos señales intensas en la región aromática, lo que indica la presencia de dos grupos metilo en la molécula, uno correspondiente al éster y otro al O-metilo del anillo.

A continuación, se enlistan las señales características de la esterificación y/o O-metilación de cada molécula: **1**: (s, 3H. 3.68 ppm). **2**: (s, 3H. 3.80 ppm). **3**: (s, 3H. 3.89 ppm). **4**: (s, 3H, 3.79 ppm). **5**: (s, 3H. 3.81 ppm). **6**: (s, 3H. 3.89 ppm). **7**: (s, 3H. 3.80 ppm). **8**: (s, 3H. 3.84 ppm), (s, 3H. 3.79 ppm). **9**: (s, 6H, 3.91 ppm), (s, 3H. 3.80 ppm). **10**: (s, 12H. 3.90 ppm). **11** (s, 3H. 3.88 ppm), (s, 3H. 3.86 ppm). **12**: (s, 3H. 3.90 ppm). **13**: (s, 3H. 3.80 ppm). **14**: (s, 3H. 3.90 ppm).

Después de la purificación y caracterización de los derivados, se evaluó su actividad citotóxica mediante el método de MTS, en células de carcinoma hepatocelular (Hep3B) las cuales se sabe tienen alteraciones de tipo epigenético, por ejemplo, la hipermetilación de los genes P16 y RASSF1a (Yuan et al., 2006; Kondo et al., 2007). Los resultados de este ensayo mostraron que los derivados de tipo benzoico ( $C_6C_1$ ) no fueron citotóxicos. Específicamente, los derivados **5**, **6**, **7**, **12** y **14** de la serie de ésteres y los derivados **10** y **11** de la serie de O-metilados tuvieron  $CI_{50}$  mayores a 100  $\mu g/mL$ , por lo tanto, estos derivados ya no fueron considerados para posteriores evaluaciones. Por lo contrario, los derivados de tipo cinámico ( $C_6C_3$ ) fueron activos, con valores de  $CI_{50}$  menores a 100  $\mu g/mL$ . Solo un derivado tipo benzoico, el 3,4 dimetoxibenzoato (**3**) tuvo una  $CI_{50}$  menor a 100  $\mu g/mL$ . La actividad citotóxica de los derivados cinámicos se explica por la presencia del doble



enlace alfa al carbonilo ya que este grupo convierte a la molécula en un aceptor de Michael el cual es un fuerte electrófilo que reacciona con nucleófilos endógenos como ADN o aminoácidos de proteínas provocando inhibición enzimática o generación de aductos que desencadenan toxicidad (Amslinger, 2010). Asimismo, otros componentes estructurales de las moléculas, como el anillo aromático y/o los grupos OH sustituyentes contribuyen a la actividad citotóxica a través de diversos mecanismos como antioxidantes, moduladores de vías de señalización, quelantes, etc. (Abotaleb et al. 2020) entre otros, de esta manera se explica por qué un derivado (**3**) que carece del doble enlace alfa a carbonilo también fue citotóxico, aunque en menor grado.

La esterificación y O-metilación que se hizo a las moléculas originales (ácidos fenólicos) fue con la finalidad de modificar sus propiedades fisicoquímicas como polaridad, *logP*, y lipofilidad, y así facilitar la penetración a la célula. Se ha comprobado que análogos más lipófilos o menos polares de los ácidos fenólicos son más activos que la molécula original de ácido (Lewandowska et al. 2016. Fiuza, et al. 2004). Un ejemplo clásico de esto son los derivados butil y fenetil éster del ácido cafeico (CAPE) los cuales han resultado más activos que el ácido original en varios estudios (Zhang et al. 2017). En nuestro trabajo, como resultado de estas modificaciones estructurales se obtuvo que los valores de  $CI_{50}$  en células Hep3B de los derivados activos **1**, **2**, **3**, **4**, **8**, **9** y **13** fueron menores en comparación con la  $CI_{50} > 100\mu\text{g/mL}$  (Sánchez C. & Nolasco Q. 2018) del ácido cafeico (ácido fenólico). Lo anterior evidencia que la esterificación mejoró la actividad citotóxica de los derivados de tipo cinámico (Tabla 6) como se mencionó anteriormente. No obstante, la esterificación y O-metilación no incrementó la actividad citotóxica de los compuestos de tipo benzoico, esto debido quizás a que el doble enlace alfa a carbonilo es la principal unidad estructural responsable de la citotoxicidad y, al estar ausente en los derivados tipo benzoico, éstos no alcanzan a incrementar su actividad pese a la optimización de sus propiedades fisicoquímicas para entrar a la célula.

La selectividad entre células sanas y cancerosas es una propiedad deseable en las moléculas que se encuentran bajo investigación, por lo tanto, en este trabajo se evaluó la selectividad en una línea celular de hepatocitos inmortalizados IHH mediante el método de MTS. Una vez que se determinó la  $CI_{50}$  de cada molécula en células sanas, se calculó el índice de selectividad (IS) con la fórmula  $CI_{50 \text{ Hep3B}} / CI_{50 \text{ IHH}}$ . Como resultado se obtuvo que el compuesto más selectivo fue el derivado **8** (4-metoxicinamato de metilo) con un IS de 11. La selectividad de los otros derivados fue media con IS entre 2 y 4.

La metilación del ADN es un evento epigenético que regula la organización del genoma. Alteraciones en la metilación conllevan a la pérdida de esta organización a través de inestabilidad o silenciamiento de genes supresores de tumores lo que desencadena entre otras patologías, cáncer (Kristensen, 2009). Algunos investigadores han demostrado que compuesto fenólicos como el ácido cafeico son capaces de inhibir *in vitro* las enzimas DNMT responsables de la metilación del ADN, además, también demostraron que estos compuestos inhibieron la metilación de regiones promotoras de genes en células cancerosas. (Woon & Bao, 2005). En este trabajo se evaluó la actividad sobre la inhibición de la metilación en células de hepatocarcinoma. Se evaluaron los derivados que fueron citotóxicos en Hep3B (**1**, **2**, **3**, **4**, **8**, **9** y **13**) así como un derivado no citotóxico (**11**) y las moléculas originales de ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido gálico) para comparar la

actividad sobre la inhibición de la metilación. Los resultados de este ensayo (Tabla 8) mostraron que los derivados **8** (4-metoxicinamato de metilo), **9** (3, 4- dimetoxicinamato de metilo) y **13** (3, 4, 5 -trimetoxicinamato de metilo) fueron los más activos, ya que su actividad inhibitoria de la metilación del ADN fue mayor a 90%. El resto de los derivados evaluados mostró también elevada actividad inhibitoria de la metilación con porcentajes entre 85% y 63%. Es destacable que el ácido cafeico (molécula original) tuvo un 39.88% de inhibición de la metilación, mientras que todos los derivados de tipo cinámico tuvieron porcentajes de inhibición incluso mayores a 90% y de 63% para el menos activo, es decir, que los derivados obtenidos fueron 1.5 veces más activos como inhibidores de la metilación en comparación con el ácido libre. No obstante, esto no sucedió con los derivados de tipo benzoico **3** (3,4-dimetoxibenzoato de metilo) y **11** (4-metoxibenzoato de metilo) ya que tuvieron porcentajes de inhibición de 74.2% y 85.44% respectivamente. Al comparar estos valores con la molécula original (ácido gálico) cuya inhibición fue de 82.48% es evidente que no hubo un incremento en la actividad inhibitoria de la metilación para los derivados de tipo benzoico. Sin embargo, como inhibidores de la metilación, estas moléculas (**3** y **11**) no son despreciables ya que lograron inhibir la metilación en más del 70 y 80% respectivamente.

Los resultados obtenidos del ensayo de la actividad inhibitoria de la metilación mostraron que todas las moléculas evaluadas, tanto de tipo benzoico como cinámico fueron activas, alcanzando en todos los casos porcentajes de inhibición superiores a 60% e incluso mayores al 90% de inhibición para los derivados cinámicos **8**, **9** y **13**. Asimismo, los derivados benzoicos **3** y **11** superaron el 70% de inhibición de la metilación. Esto demuestra que este tipo de actividad no depende del doble enlace alfa a carbonilo como en el caso de la citotoxicidad, ya que tanto los derivados cinámicos como benzoicos fueron activos. Con estos resultados suponemos que la actividad inhibitoria de la metilación podría depender de otras unidades estructurales comunes a todos los derivados obtenidos como son el anillo aromático, los sustituyentes OH y OCH<sub>3</sub> y el grupo éster. La presencia de estos grupos en todas las moléculas que fueron inhibidores de la metilación permite suponer que el mecanismo por el cual ejercen su actividad es a través de la competencia de estos compuestos fenólicos con el cofactor SAM (S-adenosil metionina) por su unión al sitio catalítico de la enzima DNMT (Vanden Berghe, 2012). No obstante, dado que todos los derivados tienen el grupo catecol en su estructura, se propone otro mecanismo que se da de manera indirecta al modular la tasa de SAM:SAH (S-adenosil metionina: S-adenosil homocisteína) como se explica a continuación: las moléculas que presentan un grupo catecol en su estructura, como los derivados de ácidos fenólicos, son metilados por la enzima catecol O-metil transferasa (COMT) en presencia de su cofactor S-adenosil metionina (SAM) que posteriormente se convierte a S-adenosil homocisteína (SAH). SAM es también el cofactor de las enzimas DNMT, sin embargo, la presencia de moléculas con grupo catecol incrementa la actividad de la enzima COMT y consume SAM, de tal manera que se reduce la cantidad disponible de SAM para que las DNMT lleve a cabo su proceso de metilación (Fang et al. 2007). De esta manera se estaría inhibiendo de manera indirecta la metilación, no a través de la inhibición de la enzima DNMT si no por medio de la modulación y consumo del cofactor SAM.

El análisis de los resultados de citotoxicidad e inhibición de la metilación deja en claro que ambas actividades no están directamente relacionadas, es decir, compuestos que son inhibidores de la metilación no precisamente son citotóxicos como sucedió con los derivados **3** y **11** los cuales no

fueron citotóxicos pero tuvieron un alto porcentaje de inhibición de la metilación, mientras que otros derivados altamente tóxicos como el **1** (cafeato de metilo) que fue el más citotóxico ( $CI_{50}$  21.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) también fue activo sobre la inhibición de la metilación (68.48%) pero no fue el mejor inhibidor. Como se muestra en la tabla 9 las moléculas no tienen el mismo grado de actividad citotóxica e inhibitoria de la metilación, es decir, los compuestos más citotóxicos no fueron los mejores inhibidores y viceversa, los mejores inhibidores no fueron los más citotóxicos. Esto puede explicarse por las diferencias entre los mecanismos propuestos de una y otra actividad. Como se mencionó anteriormente, la actividad citotóxica se atribuye principalmente al doble enlace alfa a carbonilo de los compuestos cinámicos, lo que los convierte en aceptores de Michael y facilita la formación de aductos. Asimismo, la presencia de otros grupos como el anillo aromático y sustituyentes OH confiere a las moléculas propiedades antioxidantes, quelantes, y moduladoras de vías de señalización que en último término provocan citotoxicidad (Abotaleb et al. 2020). Por otro lado, la actividad inhibitoria de la metilación, aunque en este trabajo no se evaluó mecanísticamente, se sabe que puede ocurrir por la competencia del compuesto fenólico con el cofactor SAM por el sitio activo de la enzima DNMT, o también, por la presencia del grupo catecol en la molécula fenólica, la participación de la enzima COMT y el consumo del cofactor SAM, como se explicó antes.

Como objetivo de este trabajo, se buscó sintetizar moléculas que fueran citotóxicas e inhibidores de la metilación del ADN y además que fueran preferiblemente selectivas, por lo tanto, una vez obtenidos los compuestos, se evaluaron estas tres características. Los resultados de cada uno de estos ensayos permitieron clasificar a las catorce moléculas obtenidas como no citotóxicas a aquellas con  $CI_{50} >100 \mu\text{g}/\text{mL}$  (**5**, **6**, **7**, **12**, **14**) que fueron descartadas para posteriores evaluaciones; y moléculas citotóxicas a aquellas con  $CI_{50} <100 \mu\text{g}/\text{mL}$ , que posteriormente fueron evaluadas en el ensayo de selectividad e inhibición de la metilación del ADN. Las moléculas citotóxicas, se clasificaron a su vez, en tres grupos de acuerdo con el grado de actividad que hayan presentado. En un grupo están a las moléculas **1**, **2** y **4** que fueron altamente citotóxicas e inhibidores de la metilación, pero fueron poco selectivas. En otro grupo están las moléculas **3** y **11**, las cuales mostraron un alto porcentaje de inhibición de la metilación, pero no fueron citotóxicas. Por último, tenemos el grupo donde están los derivados **8** (4-metoxicinamato de metilo), **9** (3,4 dimetoxicinamato de metilo) y **13** (3,4,5 trimetoxicinamato de metilo), los cuales se consideran los mejores candidatos de los catorce compuestos obtenidos, ya que estas moléculas fueron citotóxicas, tuvieron un alto porcentaje de inhibición de la metilación, así como una alta selectividad. Estos tres derivados, se consideran idóneos para futuras evaluaciones que permitan comprender mecanísticamente su actividad y contribuyan al desarrollo y optimización de moléculas candidatas a epifármacos. No obstante, es importante recalcar que, si bien, los derivados **8**, **9** y **13** tuvieron el mejor perfil en este estudio, otras moléculas (**1**, **2**, **4**) no deben descartarse para futuras investigaciones, ya que también tuvieron altos porcentajes de inhibición de la metilación (mayor a 60% en todos los casos) además de ser citotóxicos.

Los resultados de este trabajo permiten predecir la actividad citotóxica e inhibitoria de la metilación que tendrían moléculas análogas, además, tomando en cuenta los requerimientos estructurales para este tipo de actividades, en futuros proyectos podrían llevarse a cabo ensayos con análogos para conocer más sobre el mecanismo. Asimismo, este estudio confirmó que los derivados de menor

polaridad, en este caso de tipo éster, son más activos que las moléculas originales (ácidos fenólicos) como ya se había reportado en otros estudios, debido a la mayor lipofilia de los derivados éster en comparación con los ácidos fenólicos, lo que facilita el proceso de penetración a la célula (Lewandowska et al. 2016). Para futuras investigaciones, la evaluación de análogos de los derivados **8**, **9** y **13** sería interesante en la búsqueda de moléculas novedosas con actividad citotóxica e inhibidora de la metilación de ADN. Cabe mencionar que pese a que algunos derivados no fueron muy selectivos como el **1** (IS=1.9) no deben ser descartados debido a que en el mercado son comunes los fármacos altamente citotóxicos no selectivos como el taxol, etopósido, entre otros.

Como farmacéuticos, nuestra misión es encontrar y desarrollar moléculas activas que cumplan todos los postulados de idoneidad posibles para un fármaco como son: selectividad, estabilidad química, baja toxicidad, excelentes propiedades fisicoquímicas, entre otras; sin embargo, debemos ser conscientes de esta utopía. La molécula perfecta es una en un millón, quizás más, por lo que, como investigadores, debemos desarrollar el criterio para sacar provecho de cada molécula estudiada y saber discernir lo que nos resulta útil en ese momento según el objetivo de la investigación y lo que no, pero sin despreciar a aquellos compuestos que pudieran resultar útiles en otras investigaciones.

## 9. CONCLUSIONES

---

---

Los derivados citotóxicos (**1, 2, 4, 8, 9, 13**) obtenidos en este trabajo fueron también activos como inhibidores de la metilación, sin embargo, otros compuesto no citotóxicos como **3** y **11** también fueron inhibidores de la metilación, esto indica que estas dos actividades no están directamente relacionadas y suceden por mecanismos distintos, ya que el doble enlace alfa a carbonilo que es importante para la citotoxicidad no lo es en el caso de la actividad inhibitoria de la metilación.

Los derivados **8, 9** y **13** fueron las moléculas que mejor se adaptaron al perfil de este trabajo, ya que fueron citotóxicos, inhibidores de la metilación y selectivos. Para futuras investigaciones podrían evaluarse estos y otros análogos para determinar su mecanismo de acción.

Los derivados de tipo cinámico que tienen el doble enlace alfa a carbonilo fueron citotóxicos debido a que la presencia de este enlace convierte a las moléculas en aceptores de Michael, lo que promueve la formación de aductos y por tanto citotoxicidad. Los derivados benzoicos, al carecer de este enlace no fueron citotóxicos.

La adición de grupos metilos (esterificación y O-metilación) mejoró la actividad citotóxica de los compuestos debido a que éstos son menos polares que la molécula original (ácidos fenólicos) por lo que pueden pasar fácilmente a través de la membrana celular y alcanzar sus blancos moleculares.

Todos los derivados evaluados (de tipo cinámico y benzoico) como inhibidores de la metilación del ADN fueron activos, esto indica que esta actividad no depende del doble enlace alfa a carbonilo y por tanto no está directamente relacionada a la citotoxicidad ya que se da por otros mecanismos como puede ser la inhibición directa de la enzima o el consumo del cofactor SAM, en los cuales el doble enlace no es indispensable.

Los derivados de tipo cinámico (**1, 2, 4, 8, 9, 13**) fueron mejores inhibidores de la metilación alcanzando porcentajes mayores al 60% e incluso superiores a 90% comparados con el ácido cafeico cuyo porcentaje de inhibición fue de 39.88% esto indica que la esterificación y O-metilación incrementó esta actividad.

Los derivados de tipo benzoico (**3** y **11**) tuvieron porcentajes de inhibición de la metilación de 74.2% y 85.44% respectivamente, en tanto que el ácido gálico tuvo 82.48% por lo que en este tipo de compuestos no hubo una mejora en la actividad.

## 10. PERSPECTIVAS

---

---

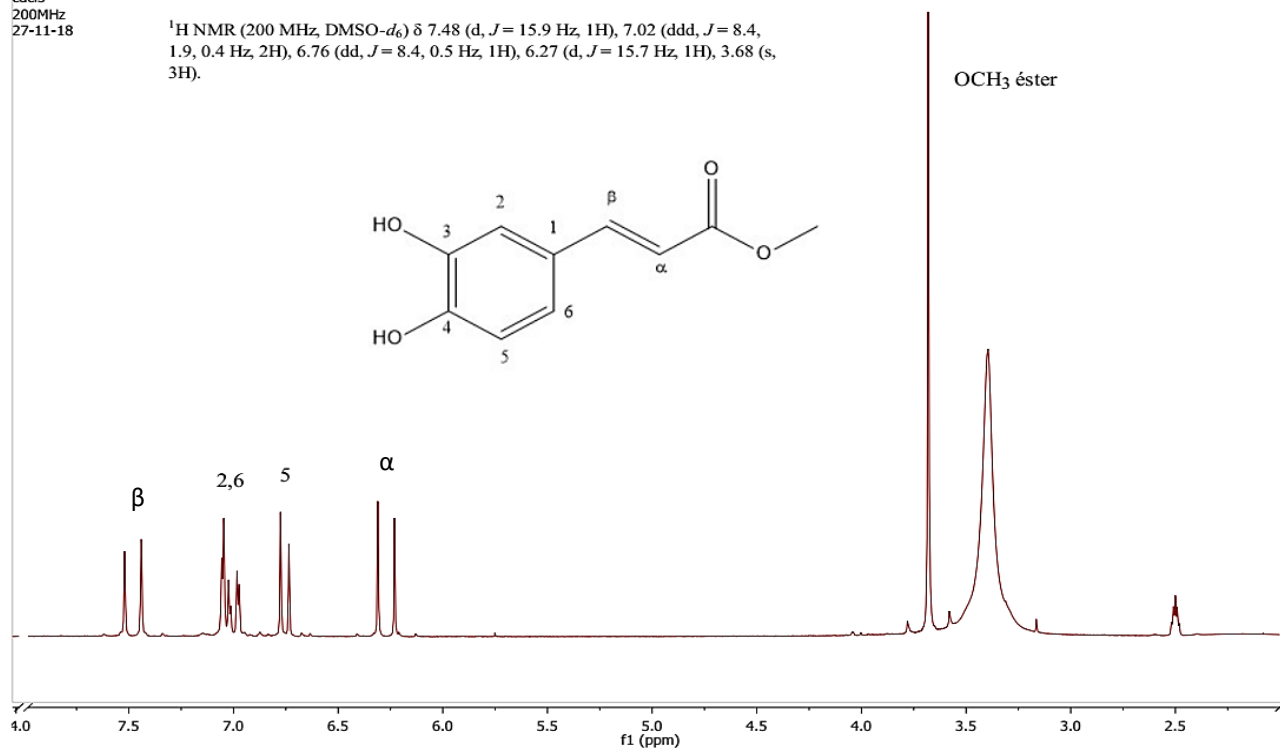
- Realizar un estudio *in silico* de relación estructura-actividad de los derivados y ácidos libres.
- Hacer un estudio de *docking* molecular entre la enzima DNMT y los derivados.
- Determinar la actividad *in vitro* de los derivados sobre la enzima DNMT.
- Determinar la actividad sobre la metilación regiones promotoras de genes específicos de los derivados obtenidos.

## **11. ANEXOS**



1H-ECA-96  
1H  
ECA-96  
cdcl3  
200MHz  
27-11-18

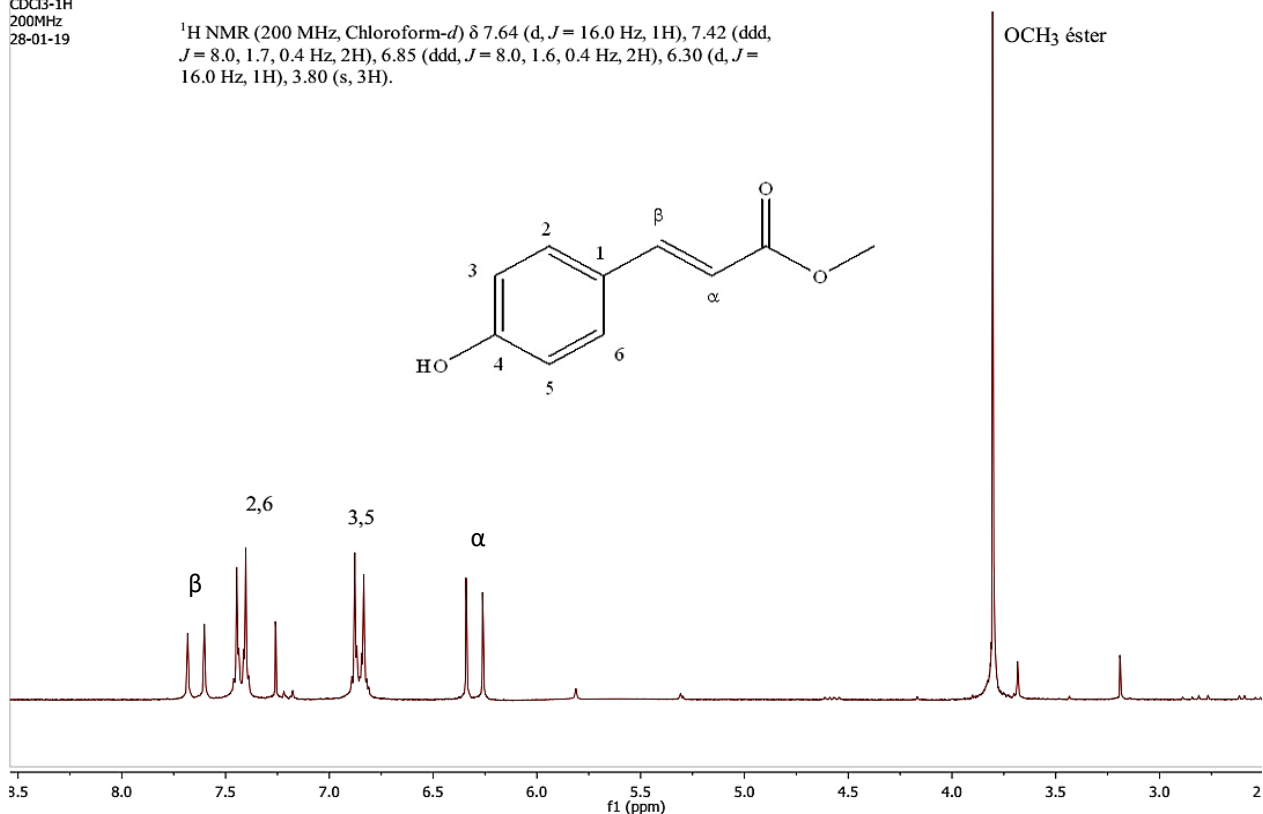
$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.48 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H), 7.02 (ddd,  $J$  = 8.4, 1.9, 0.4 Hz, 2H), 6.76 (dd,  $J$  = 8.4, 0.5 Hz, 1H), 6.27 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H).



**Espectro 1.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO, 200MHz) de 3,4 dihidroxicinamato de metilo o cafeato de metilo (1).

MAM01-3  
MAM01-3  
CDCl3-1H  
200MHz  
28-01-19

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  7.64 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 7.42 (ddd,  $J$  = 8.0, 1.7, 0.4 Hz, 2H), 6.85 (ddd,  $J$  = 8.0, 1.6, 0.4 Hz, 2H), 6.30 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H).

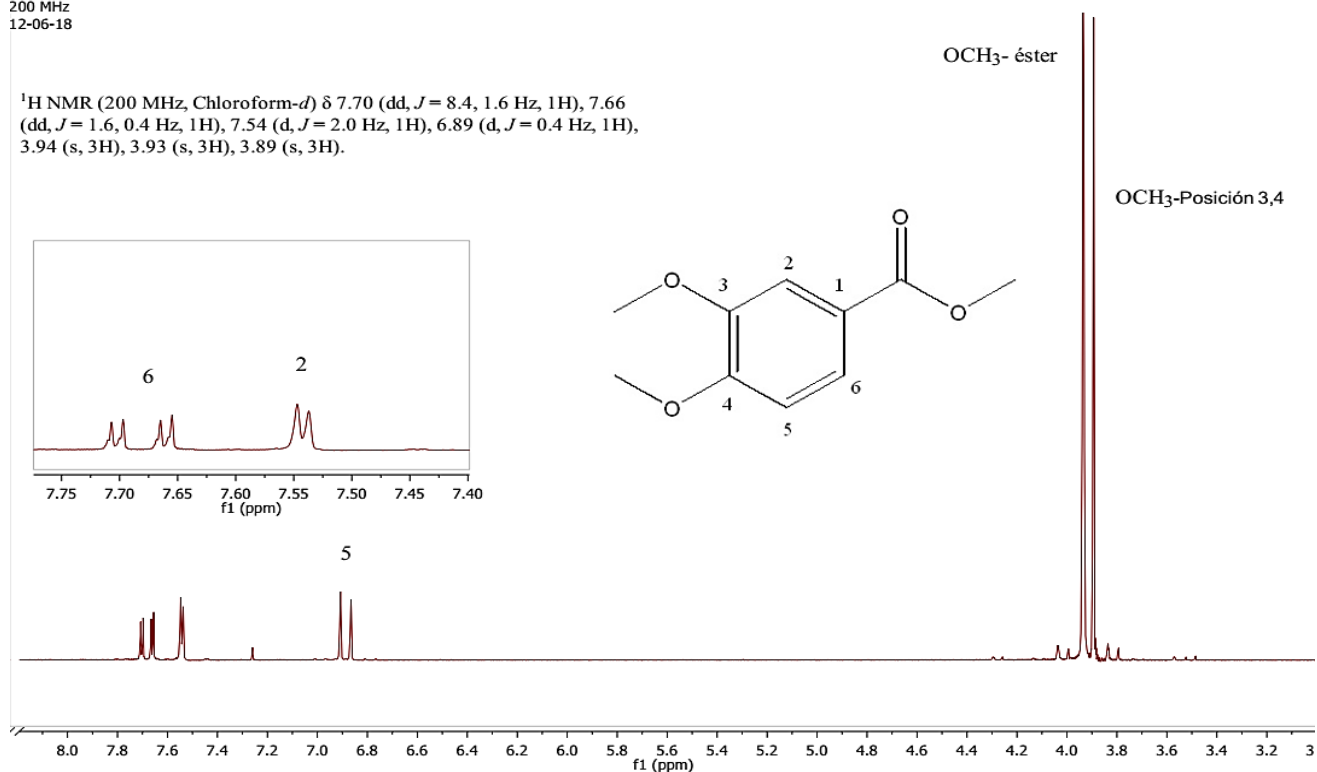


**Espectro 2.** RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 4-hidroxicinamato de metilo o cumarato de metilo (2).



1H-DICV-AME-90  
 1H  
 DICV-AME-90  
 200 MHz  
 12-06-18

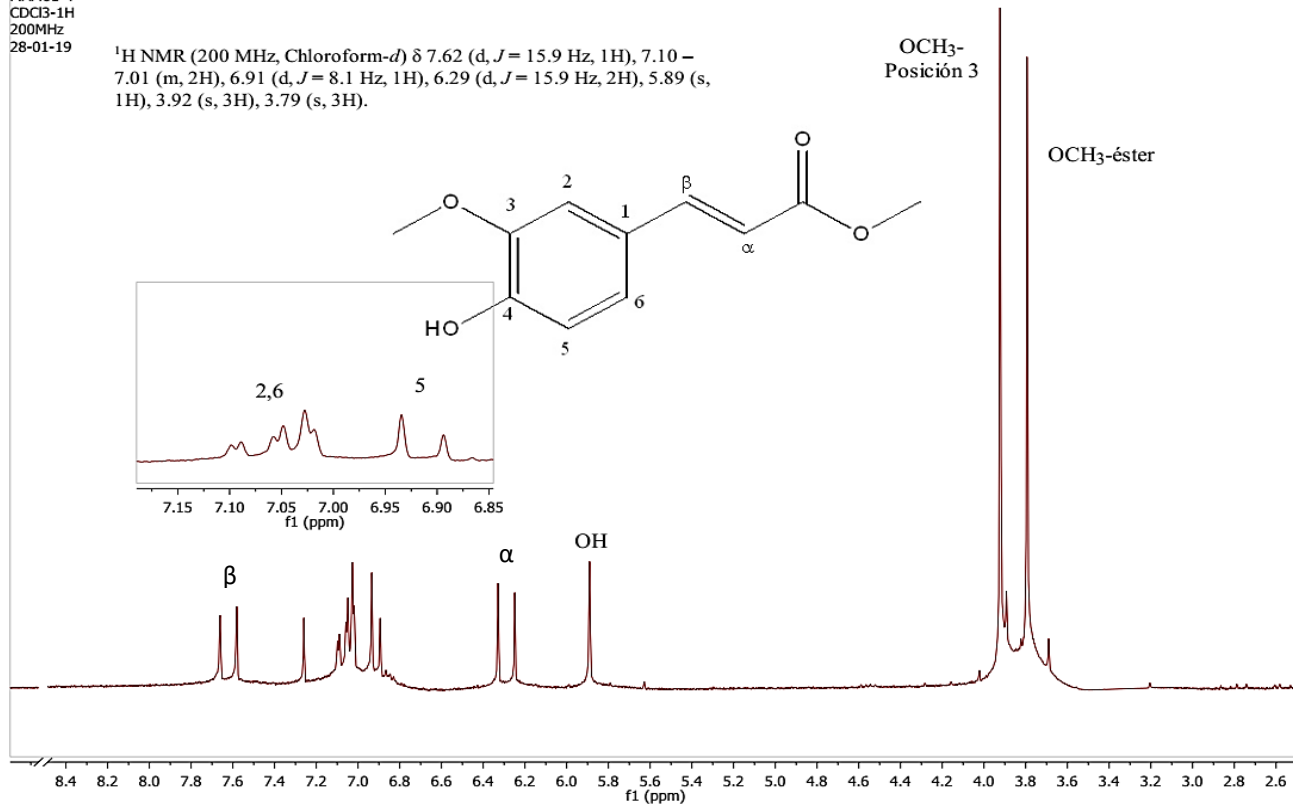
$^1\text{H NMR}$  (200 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  7.70 (dd,  $J = 8.4, 1.6$  Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J = 1.6, 0.4$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 0.4$  Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H).



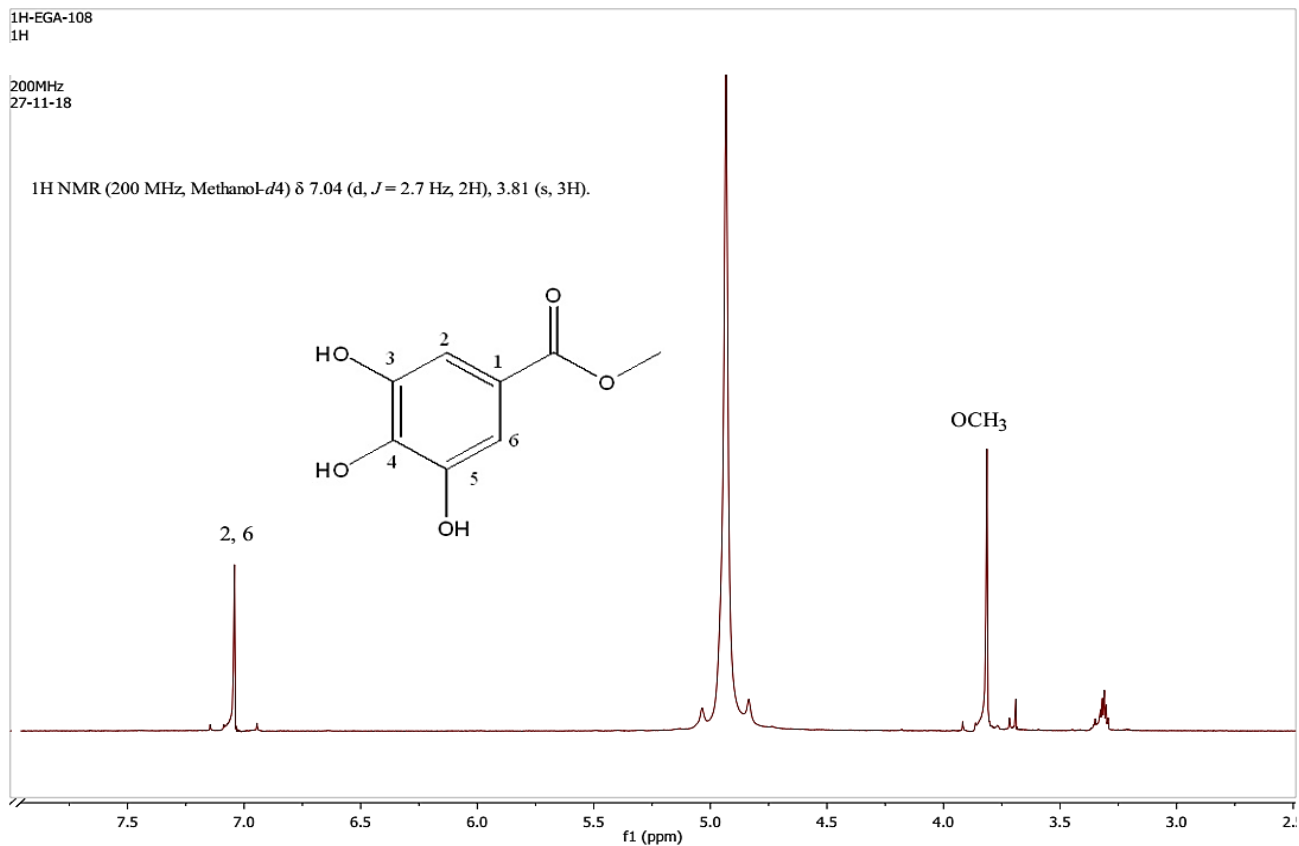
**Espectro 3.** RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz) de 3,4 dimetoxibenzoato de metilo o veratrato de metilo (**3**).

MAM01-4  
 MAM01-4  
 CDCl<sub>3</sub>-1H  
 200MHz  
 28-01-19

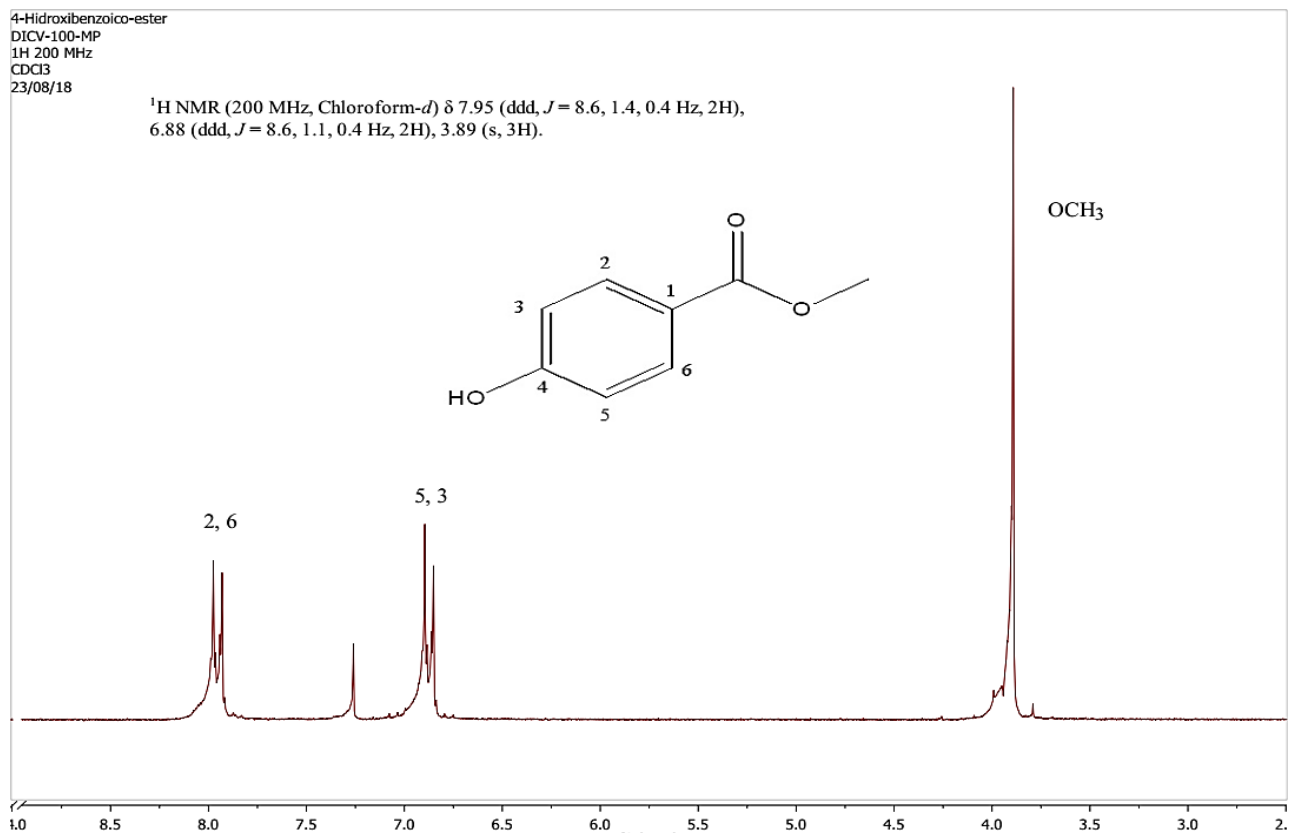
$^1\text{H NMR}$  (200 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  7.62 (d,  $J = 15.9$  Hz, 1H), 7.10 – 7.01 (m, 2H), 6.91 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J = 15.9$  Hz, 2H), 5.89 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.79 (s, 3H).



**Espectro 4.** RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 3-metoxi-4-hidroxicinamato de metilo o ferulato de metilo (**4**).



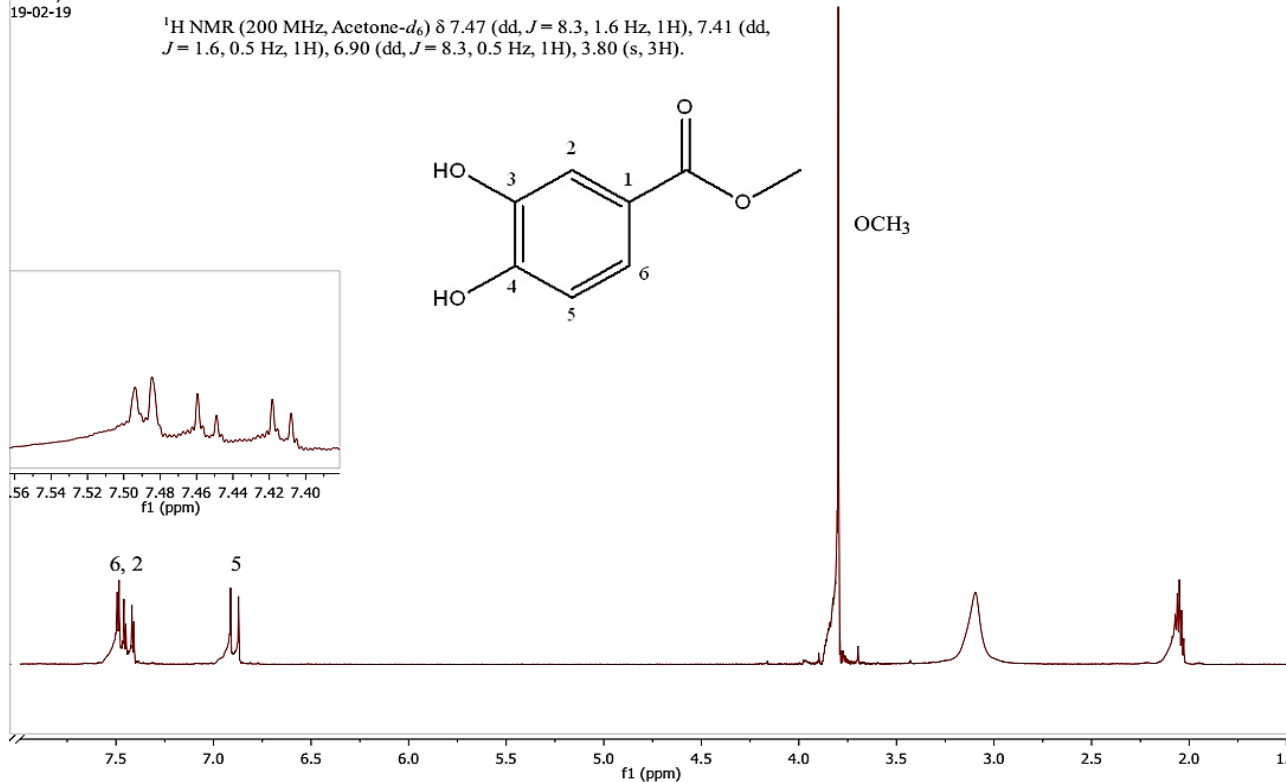
**Espectro 5.** RMN  $^1\text{H}$  (Metanol-*d*4, 200 MHz) de 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo o galato de metilo (5).



**Espectro 6.** RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 4-hidroxibenzoato de metilo o parabeno de metilo (6).

MAM01-6  
1H, CDCl3  
MAM01-6  
Mercury 200 Mhz  
19-02-19

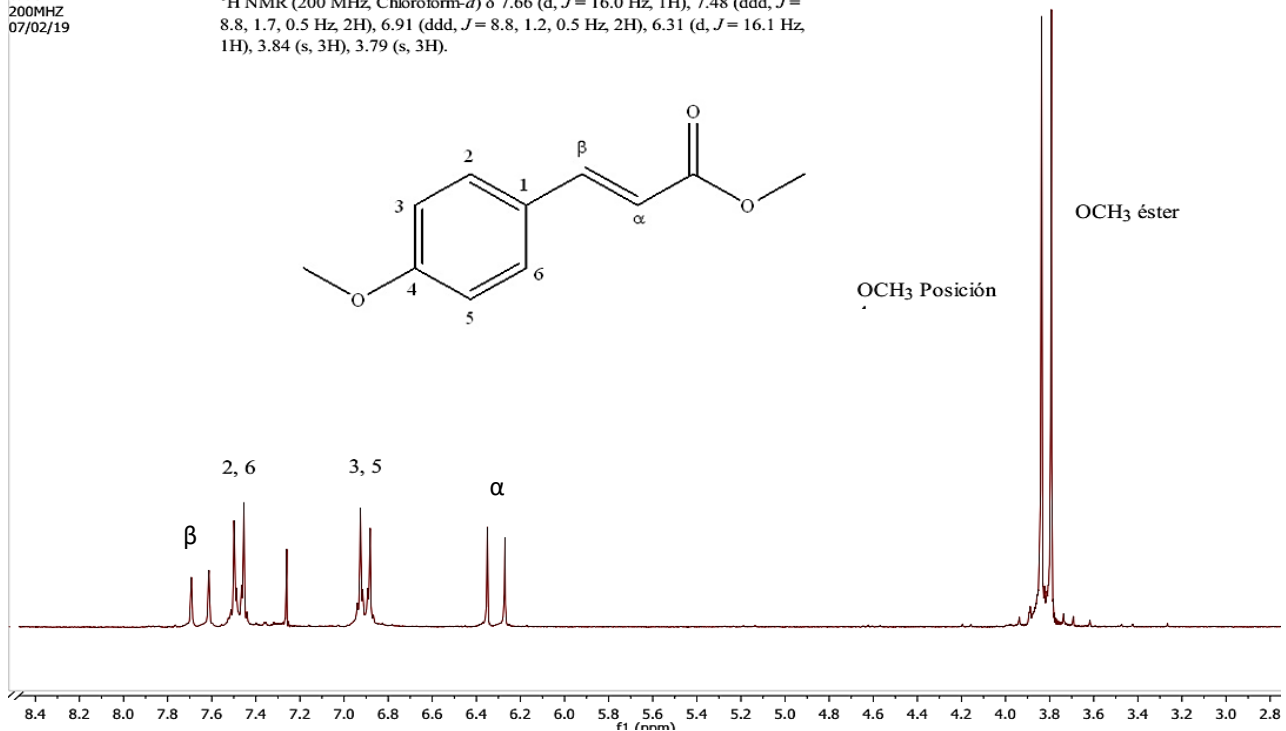
$^1\text{H NMR}$  (200 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  7.47 (dd,  $J = 8.3, 1.6$  Hz, 1H), 7.41 (dd,  $J = 1.6, 0.5$  Hz, 1H), 6.90 (dd,  $J = 8.3, 0.5$  Hz, 1H), 3.80 (s, 3H).



**Espectro 7.** RMN  $^1\text{H}$  (Acetona- $d$ , 200 MHz) de 3,4-dihidroxi benzoato de metilo (7).

1H-MAM01-5  
1H  
MAM02-7  
cdcl3  
200MHZ  
07/02/19

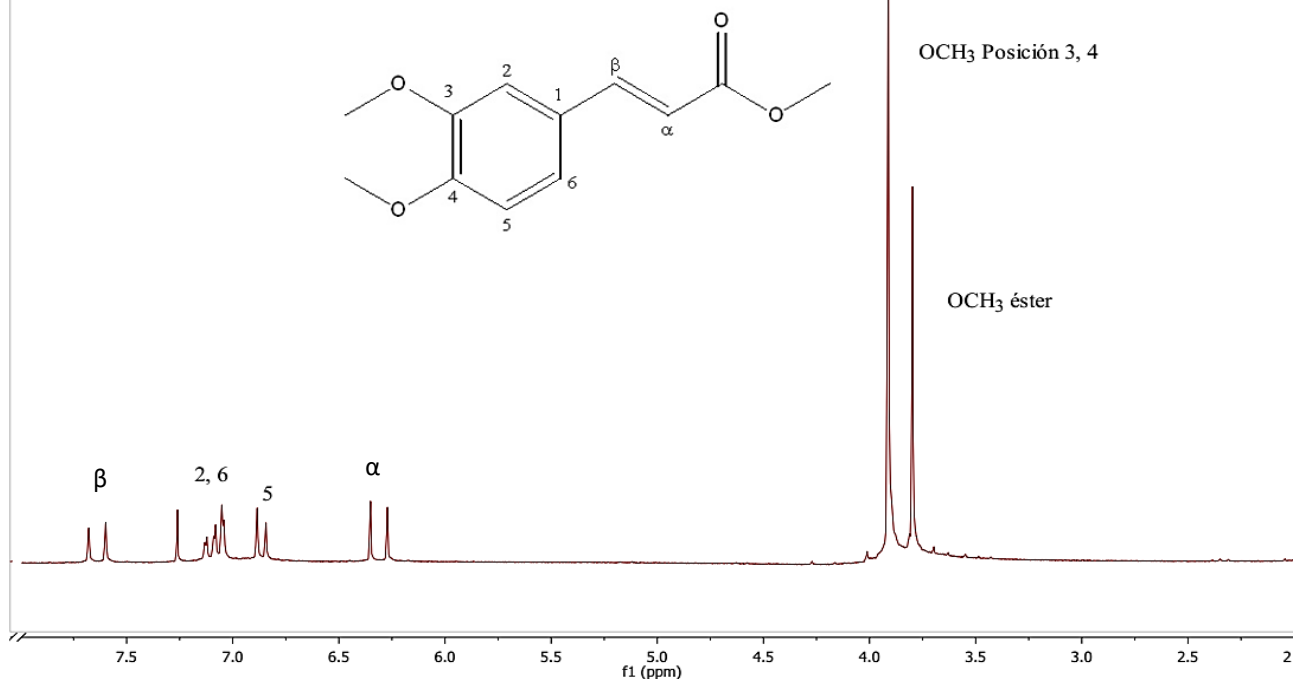
$^1\text{H NMR}$  (200 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  7.66 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.48 (ddd,  $J = 8.8, 1.7, 0.5$  Hz, 2H), 6.91 (ddd,  $J = 8.8, 1.2, 0.5$  Hz, 2H), 6.31 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H).



**Espectro 8.** RMN  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 4-metoxicinamato de metilo (8).

MAM01-2  
MAM01-2  
06-12-2018  
CDCl<sub>3</sub>  
200MHZ

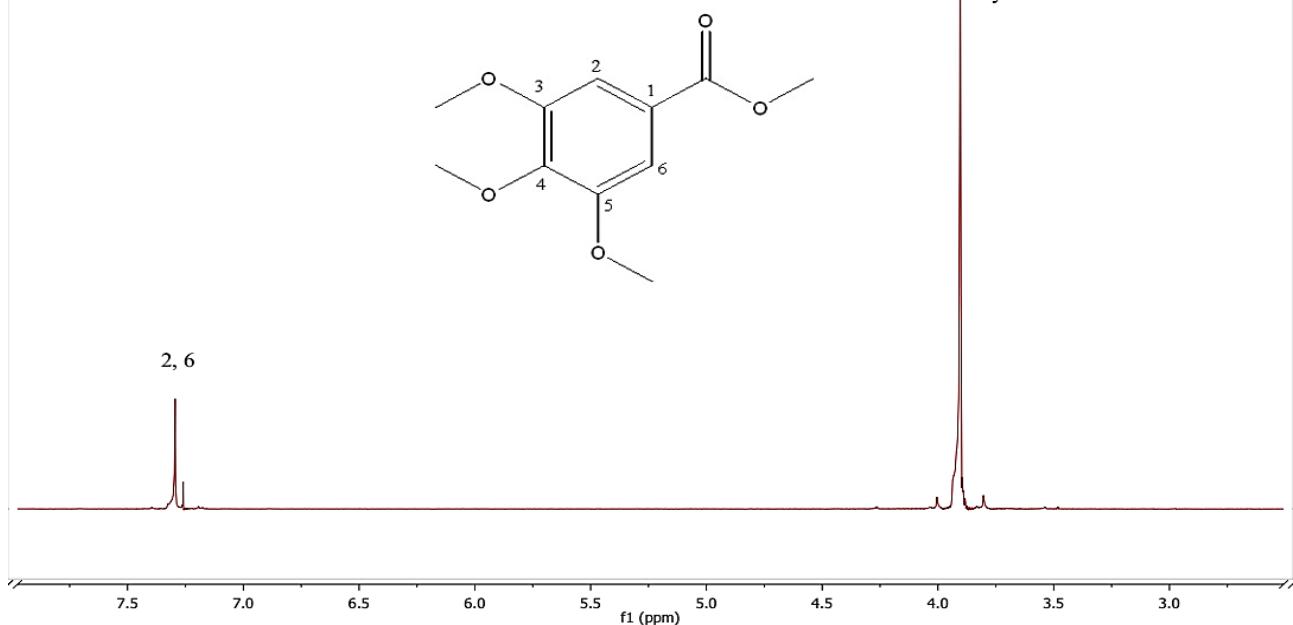
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.64 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.09 (ddd, *J* = 8.4, 1.9, 0.4 Hz, 2H), 6.86 (dd, *J* = 8.2, 0.4 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.80 (s, 3H).



**Espectro 9.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 3,4-dimetoxicinamato de metilo (**9**).

1H-MGA1-115  
1H  
MGA1-158  
cdd3  
200MHz  
27-11-18

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.30 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 12H).



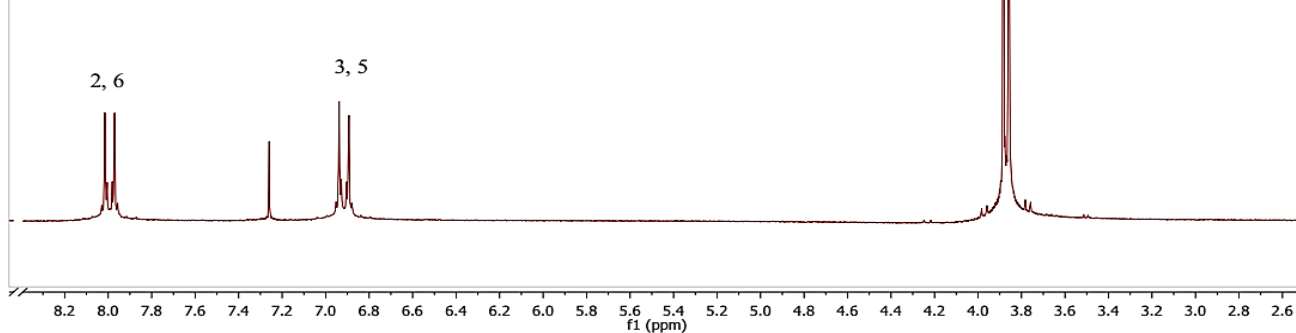
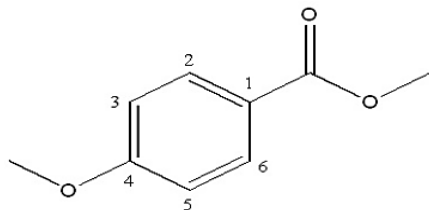
**Espectro 10.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 3, 4, 5-trimetoxibenzoato de metilo (**10**).

MAM01-1  
MAM01-1  
06-12-2018  
CDCl<sub>3</sub>  
200MHZ

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.99 (ddd, *J* = 8.6, 1.4, 0.5 Hz, 2H),  
6.92 (ddd, *J* = 8.6, 1.2, 0.5 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H).

OCH<sub>3</sub> Posición 4

OCH<sub>3</sub> éster



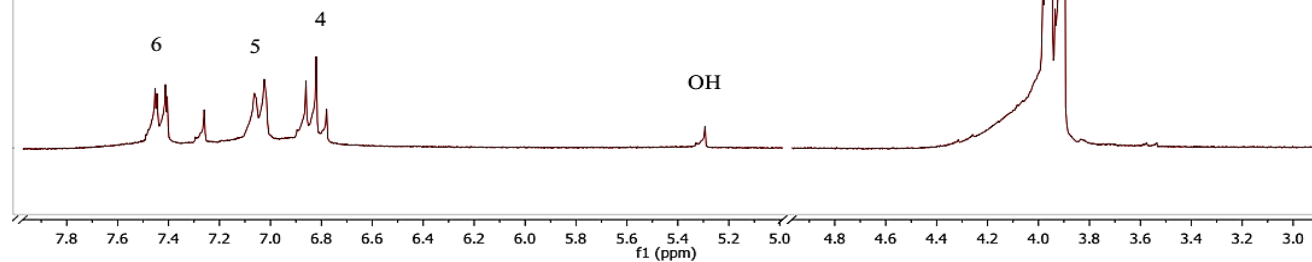
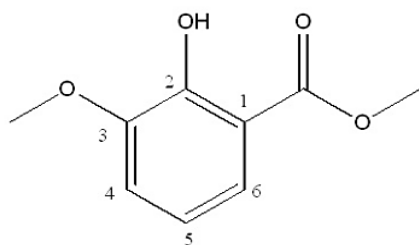
**Espectro 11.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 4-metoxibenzoato de metilo (**11**).

12  
MAM01-7  
15-03-19  
1H/CDCl<sub>3</sub>/200MHz

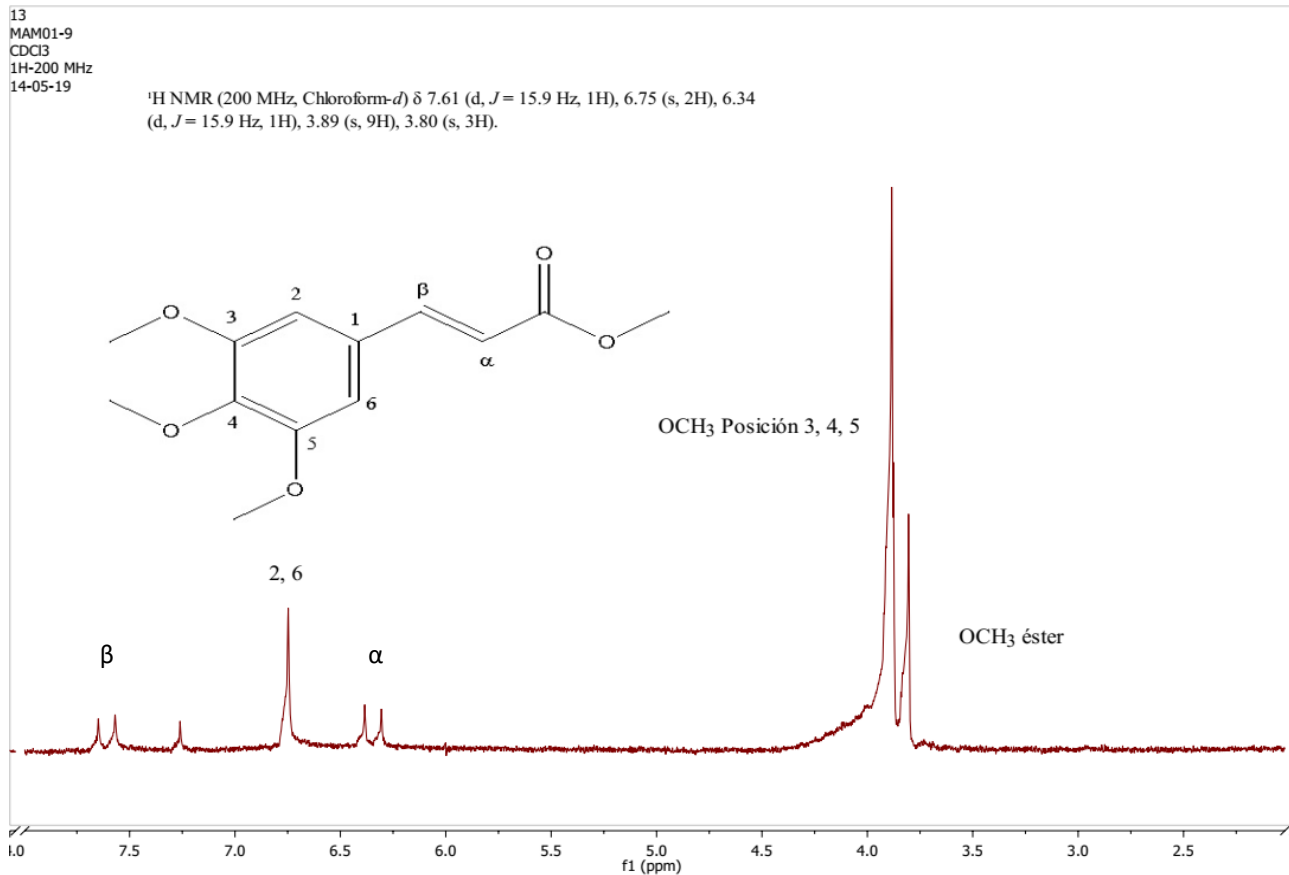
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.43 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* =  
8.5 Hz, 3H), 6.82 (dd, *J* = 8.5, 1.4 Hz, 1H), 5.29 (s, 0H), 3.96 (s, 3H), 3.90 (s,  
3H).

OCH<sub>3</sub> Posición 3

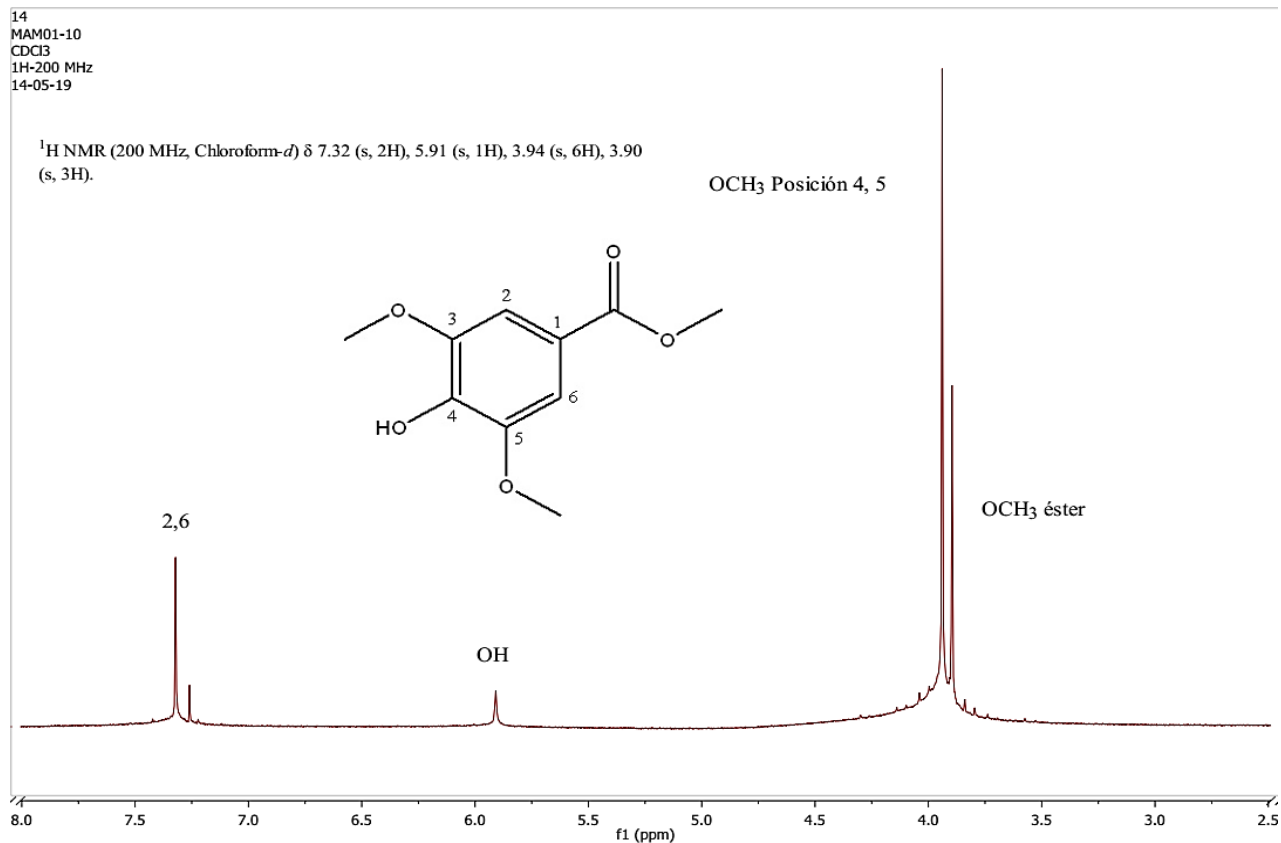
OCH<sub>3</sub> éster



**Espectro 12.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 2-hidroxi-3-metoxibenzoato de metilo (**12**).



**Espectro 13.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 3,4,5-trimetoxicinamato de metilo (**13**).



**Espectro 14.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato de metilo

### 11.1 Protocolo de CellTiter96® AQueous OneSolution Cell Proliferation Assay (modificado)

1. Descongelar el reactivo CellTiter96 a temperatura ambiente o en baño de agua a 37°C.
2. Retirar medio de cultivo de cada pozo
3. \*Realizar un lavado por triplicado con buffer de fosfatos (PBS) para eliminar el remanente de tratamientos.
4. Con una micropipeta, colocar 20 µL del reactivo más 100 µl de medio de cultivo fresco a cada pozo con células.
5. Incubar la placa a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> por dos horas protegido de la luz.
6. Leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de 96 pozos.

**\*Nota:** Dado que las moléculas evaluadas en este trabajo son antioxidantes y, por tanto, pueden reaccionar con el MTS y ocasionar ruido, se implementó un paso extra en el protocolo haciendo tres lavados con un buffer para asegurarse de eliminar cualquier remanente de las moléculas evaluadas.

### 11.2 Protocolo del kit AquaPure Genomics DNA de BioRad #Catálogo 732-6340 (Extracción de ADN, modificado).

1. Retirar el medio de cultivo de las placas de seis pozos.
2. Adicionar 100 µL de la solución de lisis celular a cada pozo.
3. Recuperar el fluido viscoso en un tubo eppendorf (un tubo para cada pozo).
4. Si se observan grumos o es muy viscoso, incubar a 37°C durante cinco minutos.
5. Una vez disminuida la viscosidad, adicionar 0.75 µL de RNAsa a cada tubo e incubar a 37°C durante 45 minutos.
6. Enfriar a temperatura ambiente y adicionar 100 µL de solución precipitante de proteínas a cada tubo.
7. Centrifugar a máxima velocidad por cinco minutos o más hasta obtener un pellet compacto.
8. Incubar en hielo por cinco minutos.
9. Retirar el sobrenadante que contiene el ADN y colocarlo en tubos limpios cuidando de no arrastrar restos del pellet de proteínas,
10. Adicionar 300 µL de isopropanol a cada tubo, tapar e invertir cuidadosamente hasta observar la formación de la hebra de ADN (si la hebra no es visible, centrifugar).
11. Retirar exceso de sobrenadante y recuperar la hebra o pellet de ADN en un tubo limpio.
12. Invertir el tubo y secar sobre papel absorbente.

13. Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% e invertir el tubo suavemente para lavar el ADN.
14. Centrifugar a máxima velocidad durante tres minutos.
15. Retirar cuidadosamente el sobrenadante, sacudir el tubo para eliminar el exceso de etanol y secar sobre papel absorbente.

#### Hidratación de ADN

Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril a cada tubo. Congelar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su uso a mediano plazo o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su uso a largo plazo.

### 11.3 Protocolo del kit MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric) de Epigentek.

#### Preparación de buffer de lavados y control positivo

1. Diluir el buffer de lavados ME1 10 X (incluido en el kit) a una concentración de 1X con agua destilada.
2. Preparar el control positivo ME4 haciendo una dilución con buffer TE 1X. Para control de un solo punto colocar en un tubo limpio 1  $\mu\text{L}$  de ME4 + 3  $\mu\text{L}$  de buffer TE 1X para obtener una concentración de 5 ng/ $\mu\text{L}$ .

#### Unión de ADN

1. Determinar el número de pozos a utilizar y retirar de la placa los sobrantes.
2. Adicionar 80  $\mu\text{l}$  de la solución ME2 a cada pozo asegurándose de cubrir todo el fondo.
3. Adicionar a los pozos correspondientes 1  $\mu\text{L}$  de la solución ME3 (control negativo), 1  $\mu\text{L}$  de la solución ME4 (control positivo) previamente diluida y 100 ng de ADN (previamente aislado).
4. Cubrir la placa con la incluida o parafilm e incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 90 minutos.
5. Retirar la solución de cada pozo y lavar por triplicado con 150  $\mu\text{L}$  del buffer ME1 1X.

#### Captura de ADN metilado

1. Diluir la solución ME5 a una proporción 1:1000 con el buffer ME1 1X.
2. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de la solución anterior a cada pozo. Cubrir e incubar a temperatura ambiente por una hora.
3. Retirar la solución ME5 y lavar cada pozo por triplicado con 150  $\mu\text{L}$  del buffer ME1 1X.
4. Preparar una dilución 1:2000 de la solución ME6 con el buffer ME1 1X.
5. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de la solución anterior a cada pozo, cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
6. Remover la solución ME6 de cada pozo y lavar cuatro veces con 150  $\mu\text{L}$  de ME1 1X.
7. Preparar una dilución 1:5000 de la solución ME7 con el buffer ME1 1X.



8. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de la solución anterior a cada pozo, cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
9. Retirar la solución ME7 y lavar cada pozo cinco veces con 150  $\mu\text{L}$  de buffer ME1 1X.

## 12. REFERENCIAS

---

---

- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2020). Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules*, 1-22.
- Aguilera-Castillo, O., Depreux, P., Halby, L., Arimondo, P. B., & Goossens, L. (2017). DNA Methylation Targeting: The DNMT/HMT Crosstalk Challenge. *biomolecules 2017*, 7,3, 1-21.
- Aldawsari, F., Aguayo Ortíz, R., & Kapilashrami, K. (2015). Resveratrol-salicylate derivatives as selective DNMT3 inhibitors and anticancer agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016; 31(5): 695–703.
- Amslinger, S. (2010). The Tunable Functionality of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl Compounds Enables Their Differential Application in Biological Systems. *ChemMedChem*, 351-356.
- Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., & Vimalambike, M. G. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutritional Journal*.
- Atmani, D., Ruíz, L. B., Ruíz, S. J., Lizcano, L. J., Bakkali, F., & Atmani, D. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(4)*, 589-598.
- Basu, A., Saito, K., Meyer, K., & Ray, R. B. (2006). Stellate cell apoptosis by a soluble mediator from immortalized human hepatocytes. *Apoptosis*, 1391-1400.
- Bo, N., Li, W. Z., & Wang, R. (2016). Targeting epigenetic regulations in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016 48(1), 97-109.
- Bo, R. Y., Hwa, J. M., Yon, H. H., & Woo, H. P. (2010). Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1334-1340.
- Brown, R., & Strathdee, G. (2002). Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends in Molecular Medicine Vo.8 No. 4*, 43-48.
- Brueckner, B., & Lyko, F. (2004). DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for epigenetic cancer therapy. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, Vol.25 No.11 November 2004.
- Champion, C., Guianvar'ch, D., Sénamaud-Beaufort, C., Jurkowzka, R. Z., Jeltsch, A., Ponger, L., . . . Guieysse-Peugeot, A.-L. (2010). Mechanistic Insights on the Inhibition of C5 DNA Methyltransferases by Zebularine. *PLoS ONE Vol.5 Issue 8*, 1-11.

- Chan, K., & O'Brien, P. J. (2008). Structure–activity relationships for hepatocyte toxicity and electrophilic reactivity of a,b-unsaturated esters, acrylates and methacrylates. *JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY*, 1004-1015.
- Delgado-Coello, B. A. (2011). ¿Qué es la epigenética? *Ciencia*, 73-82.
- Desjobert, C., Mounir, E. M., Gerard, H. T., Guianvarc'h, D., Carrier, A., Pottier, C., . . . Riond, J. (2015). Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells. *Epigenetics*, 82-91.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Product: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition*. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Dueñas, G. A., Coronel, J., Cetina, L., González, F. A., Chávez, B. A., & Taja, C. L. (2014). Hydralazine-valproate: A repositioned drug combination for the epigenetic therapy of cancer. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*.
- Elniski, L. (23 de 10 de 2018). *National Human Genome Research Institute*. Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=529>
- Esteler, M. (2003). Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncology*, 351-358.
- Fahrioglu, U., Dodurga, Y., Elmas, L., & Secme, M. (2016). Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells in vitro. *Gene* 576, 476-482.
- Fang, M., Chen, D., & Yang S., C. (2007). Dietary Polyphenols May Affect DNA Methylation. *The Journal Nutrition*, 223-228.
- Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., & Girao da Cruz, M. T. (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties– a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12, 3581-3589.
- GNYSZKA, A., JASTRZEBSKI, Z., & FLIS, S. (2013). DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging. *Anticancer Research*, 2989-2996.
- Gros, C., Fahy, J., Halby, L., & Isabelle, D. (2012). DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches. *Biochimie*, 2280-2296.
- Gupta, S., Hussain, T., & Mukhtar, H. (2003). Molecular pathway for (–)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 410, 177-185.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry* 173 , 501-513.
- Hermann, A., Gowher, H., & Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2571-2587.

- Johnson, C., Warmoes, M. O., Shen, X., & Locasale, J. W. (2015). Epigenetics and Cancer Metabolism. *Cancer Letters* 356, 309-314.
- Kabala-Dzik, A., Rszpecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzebska-Stojko, Z., & Stojko, S. (2017). Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. *Nutrients*, 9, 1144, 1-19.
- Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*, 1-9.
- Kamatham, S., Kumar, N., & Gudipalli, P. (2015). Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Toxicology Reports*, 520-529.
- Kondo, Y., Shen, L., Suzuki, S., Kurokawa, T., Mazuko, K., Tanaka, Y., . . . Mizuno, Y. (2007). Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology Research*, 974-983.
- Kristensen Sommer, L., Nielsen, M. H., & Hansen Lotte, L. (2009). Epigenetics and cancer treatment. *European Journal of Pharmacology*, 131-142.
- Kungulovski, G., & Jeltsch, A. (2016). Epigenome Editing: State of the Art, Concepts, and Perspectives. *CellPress*.
- Lewandovzka, H., Kalinowzka, M., & Lewandovzky, W. (2016). The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *Journal of Biochemical Chemistry* 32, 1-19.
- Lewandowszka, U., Fishna, J., & Gorlach, S. (2016). Enhancement of anticancer potential of polyphenols. *Biochemical Pharmacology* 109, 1-13.
- Link, A., Balaguer, F., & Goel, A. (2010). Cancer Chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology Vol.80*, 1771-1792.
- Liu, M., Jiang, L., & Guan, X.-J. (2014). The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein & Cell*, 673-691.
- Locatelli, C., Leal, P. C., Yunes, R. A., Nunes, R. J., & Creczynski-Pasa, T. B. (2009). Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chemico-Biological Interactions* 181, 175-184.
- Medina-Franco, J. L., & Caulfield, T. (2011). Advances in the computational development of DNA methyltransferase inhibitors. *Drug Discovery Today Vol.16 Nombres 9/10*, 418-425.
- Medina-Franco, J. L., Méndez-Lucio, Ó., Dueñas-González, A., & Jakyung, Y. (2015). Discovery and development of DNA methyltransferase inhibitors using in silico approaches. *Drug Discovery Today Vol.20, Number 5*, 569-577.
- Morera, L., Lubbert, M., & Jung, M. (2016). Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clinical Epigenetics*, 1-16.

- Morin Jr., P., St-Coeur, P.-D., Doiron, J. A., Cormier, M., Poitras, J. J., Surette, M. E., & Touaibia, M. (2017). Substituted Caffeic and Ferulic Acid Phenethyl Esters: Synthesis, Leukotrienes Biosynthesis Inhibition, and Cytotoxic Activity. *Molecules* 22, 1124, 1-17.
- National Cancer Institute. (10 de 2018). *Instituto Nacional del Cáncer*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- OMS. (Septiembre de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pechalrieu, D., Etievant, C., & Arimondo, P. B. (2017). DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to traslational studies. *Biochemical Pharmacology* 129, 1-13.
- Pellerito, C., Morana, O., Ferrante, F., Calvaruso, G., Notaro, A., Sabella, S., & Fiore, T. (2015). Synthesis, chemical characterization, computational studies and biological activity of new DNA methyltransferases (DNMTs) specific inhibitor. Epigenetic regulation as a new and potential approach to cancer therapy. *Journal of Inorganic Chemistry*, 18-27.
- Pin, V. N., Guerrero, M. A., & Delgado, B. M. (2014). Hepatocarcinoma: estado actual. *Galicia Clínica*, 171-181.
- Qi, Y., Wang, D., Wang, D., Jin, T., Yang, L., Wu, H., . . . Wang, R. (2016). HEDD: the human epigenetic drug database. *Database*, 1-10.
- Raggi, C., & Invernizzi, P. (2013). Methylation and liver cancer. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* , 564-571.
- Sánchez, C. J., Álvarez, L., Marquina, B. S., Salas, V. E., Cuevas, V., Jiménez, A. W., . . . González, M. L. (2017). Phenolic Compounds Isolated from *Caesalpinia coriaria* Induce S and G2/M Phase Cell Cycle Arrest Differentially and Trigger Cell Death by nterfering with Microtubule Dynamics in Cancer Cell Lines. *Molecules*, 1-14.
- Sánchez-Carranza, J., & Nolasco-Quintana, N. (Enero de 2018). Determinación de CI50 de ácidos fenólicos. *Ensayo de laboratorio, no publicado*. Cuernavaca, Morelos.
- Schönherr, H., & Cernak, T. (2013). Profound Methyl Effects in Drug Discovery and a Call for New CH Methylation Reactions. *Angewandte Reviews*, 12256 – 12267.
- Simmons, D. (2018). *Scitable (by nature education)*. Obtenido de Scitable (by nature education): <https://www.nature.com/scitable/topicpage/epigenetic-influences-and-disease-895>
- Subramanian, D., Thombre, R., Dhar, A., & Anant, S. (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in Oncology Vol. 4*, 1-13.
- Susuki, T., Tanaka, R., Hamada, S., Nakawaga, H. i., & Miyata, N. (2010). Design, synthesis, inhibitory activity, and binding mode study of novel DNA methyltransferase 1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 , 1124-1127.
- Vanden Berghe, W. (2012). Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacological Research*, 565-576.

- Wan Yun, P., Cayden Pang, P. W., & Zhiqiang, G. (2016). DNA Methyltransferase Activity Assays: Advances and Challenges. *Theranostics Vo.16 Issue 3*, 369-391.
- Wang, T., Gong, X., Jiang, R., Li, H., Du, W., & Kuang, G. (2016). Ferulic acid inhibits proliferation and promotes apoptosis via blockage of PI3K/Akt pathway in osteosarcoma cell. *Am J Transl Res 2016; 8(2)*, 968-980.
- Weixia, L., Nianguan, L., Yuping, T., Baoquan, L., Li, L., & Xu, Z. (2012). Evaluation and structure–activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22*, 6085–6088.
- Won Jun, L., & Bao Ting, Z. (2006). Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis Vol.27 No.2*, 269-277.
- Woon, J. L., & Bao, T. Z. (2005). Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis vol.27*, 269-277.
- Yang, G., Yang, F., Malakhova, M., Kurinov, I., Zhu, F., Yao, K., . . . L, W. (2014). Caffeic acid directly targets ERK1/2 to attenuate solar UV- induced skin carcinogenesis. *Cancer Prev Res 7(10)*, 1056-1066.
- Yang, Y., Li, Y., Wang, K., Wang, Y., Yin, W., & Li, L. (2013). P38/NF- $\kappa$ B/Snail Pathway Is Involved in Caffeic Acid Induced Inhibition of Cancer Stem Cells-Like Properties and Migratory Capacity in Malignant Human Keratinocyte. *PLOS ONE Vol.8 Issue 3*.
- Yoo, J., & Medina-Franco, J. L. (2013). Molecular Modeling Studies of the Novel Inhibitors of DNA Methyltransferases SGI-1027 and CBC12: Implications for the Mechanism of Inhibition of DNMTs. *PLoS ONE Vol.8 Issue 4*, 1-13.
- Yuan, Y., Wang, Y., Li, J., Wang, L., Yang, Z., Zhang, C., & Dai, J. L. (2006). Frequent Epigenetic Inactivation of SpleenTyrosine Kinase Gene in Human Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*.
- Zhang, X. Y., Gao, Z. M., Yuan, J., & Zhang, Z. (2017). Caffeic acid n-butyl ester-triggered necrosis-like cell death in lung cancer cell line A549 is prompted by ROS mediated alterations in mitochondrial membrane potential. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2017:21*, 1665-1671.
- Zhang, Z.-M., Liu, S., Lin, K., Luo, Y., & Perry, J. J. (2015). Crystal Structure of Human DNA methyltransferase 1. *Journal of molecular biology (427)*, 2520-2531.