



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

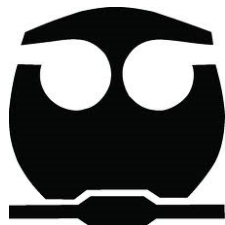
ESTUDIO DEL AMINOÁCIDO L-ESPINACINA COMO
AGENTE QUIMIOPREVENTIVO: SÍNTESIS,
ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y EVALUACIÓN *IN*
VITRO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA

BÁRBARA ALEJANDRA LERATE ROSALES



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Dr. Francisco Hernández Luis
VOCAL: **Profesor:** Dra. Paulina del Valle Pérez
SECRETARIO: **Profesor:** Dr. Javier Ordóñez Hernández
1er. SUPLENTE: **Profesor:** Dr. José Luis Medina Franco
2º SUPLENTE: **Profesor:** Dr. Audifas Salvador Matus Meza

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El trabajo se realizó en los siguientes lugares: laboratorio 121, Edificio E de la Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección del Dr. Francisco Hernández Luis y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias CMN siglo XXI, IMSS, bajo la supervisión de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Francisco Hernández Luis

SUSTENTANTE:

Bárbara Alejandra Lerate Rosales

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, específicamente a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional y personal.

Al Subprograma 127 de Formación Básica en Investigación por la beca otorgada para el financiamiento de este proyecto.

A la Unidad de Servicios Analíticos (USAI) de la Facultad de Química UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y de Espectroscopia de Infrarrojo.

A la Dirección General de Profesiones (DGAPA) por el apoyo otorgado para la compra de sustancias y materiales para los procesos de síntesis de los compuestos a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218117.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo en la compra de los materiales necesarios para la realización de todos los ensayos biológicos a través del proyecto CONACyT-SEP CB-220664.

A la Facultad de Química, UNAM por el apoyo para la realización de los estudios de espectroscopía y espectrometría a través del PAIP 5000-9136.

ÍNDICE

1.0 INTRODUCCIÓN	6
2.0 ANTECEDENTES	7
2.1 CÁNCER A NIVEL MUNDIAL Y EN MÉXICO	7
2.2 CARCINOGENÉISIS	8
2.3 ETAPAS DE LA CARCINOGENÉISIS	8
2.4 CÁNCER CERVICOUTERINO	10
2.5 CÁNCER DE PULMÓN	10
2.6 CÁNCER COLORECTAL	12
2.7 ¿QUIMIOTERAPIA O QUIMIOPREVENCIÓN?	13
2.8 PRODUCTOS NATURALES: UNA NUEVA ALTERNATIVA	13
2.9 L-ESPINACINA UNA NUEVA MOLÉCULA QUIMIOPROTECTORA	15
3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4.0 HIPÓTESIS	17
5.0 OBJETIVOS	18
5.1 OBJETIVO GENERAL	18
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:	18
6.0 METODOLOGÍA	19
6.1 SÍNTESIS DEL AMINOÁCIDO L-ESPINACINA	19
6.1.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	19
6.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	20
6.2.1 Preparación de la diana	20
6.2.2 Preparación del ligando	20

6.2.3 Acoplamiento molecular	20
6.3 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	21
7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL COMPUESTO L-ESPINACINA	22
7.1.1 L-ESPINACINA	22
7.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	24
7.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS	28
7.4 NUEVO ESTUDIO COMPUTACIONAL: ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE L-ESPINACINA CON MERTK	31
8.0 CONCLUSIONES	33
9.0 PERSPECTIVAS	33
10. REFERENCIAS	34
ANEXO I: PARTE QUÍMICA	36
ANEXO II: COLECCIÓN DE ESPECTROS IR Y RMN ¹ H	39
ANEXO III: ACOPLAMIENTO MOLECULAR	41
ANEXO IV: PARTE BIOLÓGICA	42

1.0 INTRODUCCIÓN

La palabra cáncer engloba a un grupo de enfermedades que tienen en común el crecimiento y división descontrolada de las células debido a la falla en algún mecanismo que regula su proliferación. Estas enfermedades son de etiología multifactorial, es decir, pueden originarse por distintas causas incluyendo los hábitos de vida como la dieta o la ocupación profesional; además pueden presentarse en casi cualquier tipo de tejido en el cuerpo humano.

En los últimos años se ha presentado un incremento a nivel mundial en la cantidad de personas que padecen algún tipo de cáncer. Estas enfermedades son una de las principales causas de muerte en México por lo que se considera un problema de salud pública grave.

Los principales tipos de cáncer que afectan a los mexicanos distinguiendo género son: el cáncer de pulmón (hombres), cáncer cervicouterino (mujeres) y cáncer colorectal (ambos sexos), para los cuales se han implementado distintos tratamientos como quimioterapia o radioterapia, sin embargo estos no han demostrado ser completamente exitosos y tienen muchas desventajas para los pacientes, como son: la gran cantidad de efectos adversos debido a su falta de selectividad y la resistencia que generan ciertos tipos de cáncer a los agentes quimioterapéuticos que se emplean.

La quimioprevención que implementa productos naturales es una de las nuevas estrategias que pueden ser empleadas para inhibir o retrasar la carcinogénesis antes de la invasión de esta enfermedad. Estos compuestos pueden ser clasificados en cuatro categorías: hormonales, medicamentos, agentes relacionados con la dieta o vacunas.

En reportes recientes se determinó que la L-espinaquina presenta citotoxicidad frente a la línea celular SiHa de cáncer cervicouterino. Así mismo, estudios computacionales proponen que este compuesto puede ser un nuevo agente quimiopreventivo para el cáncer.

Con la intención de ampliar el panorama sobre la actividad de este compuesto en este trabajo de tesis se realizó la síntesis de la L-espinaquina, estudios computacionales para conocer el posible modo de unión ligando-proteína con las principales dianas moleculares implementadas en la terapéutica de estos padecimientos y su respectiva evaluación en diversas líneas celulares de los principales tipos de cáncer que afectan a la población mexicana

2.0 ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER A NIVEL MUNDIAL Y EN MÉXICO

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolable de células anormales y la propagación de estas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2014, las principales neoplasias causantes de mortalidad en la población femenina fueron el cáncer de mama (15.8%) y cervicouterino (12%); en hombres, próstata (17.0%) y pulmón (11.7%). (Figura 1).

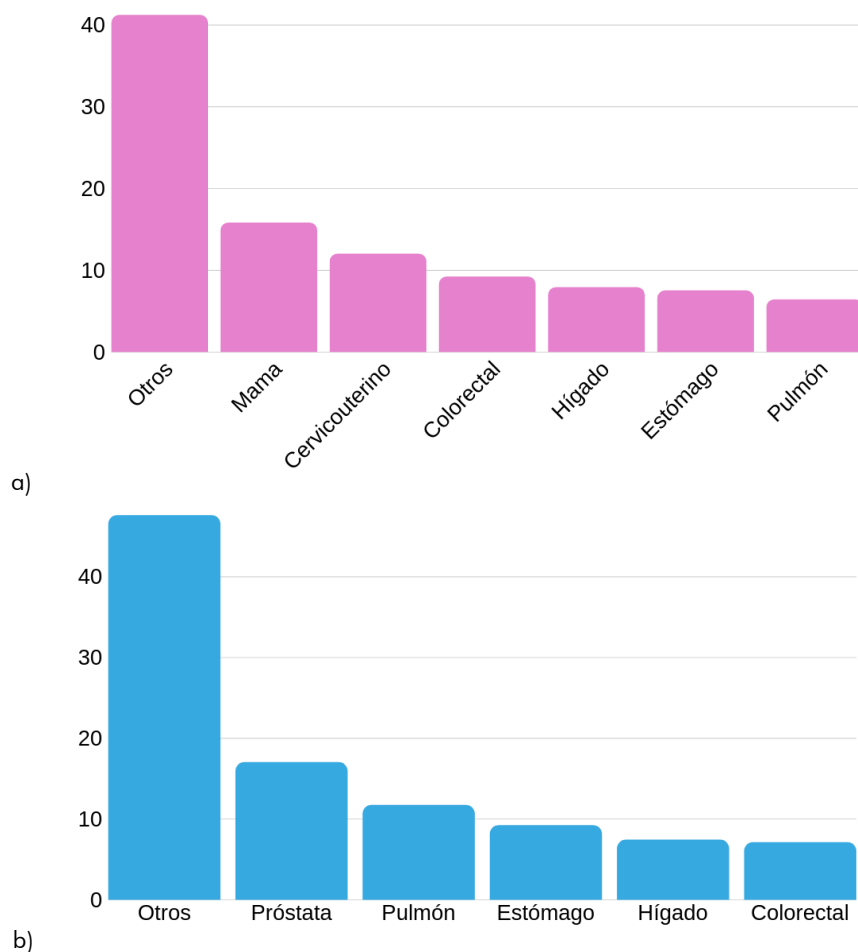


Figura 1. Prevalencia del cáncer en México en el 2014. a) mujeres, b) hombres.¹

En México se le considera un problema de salud pública grave ya que es una de las principales causas de muerte. En 2016, la cifra fue 82501 fallecimientos, siendo la tercera causa de muerte. Sin embargo, cada año estas cifras aumentan a pesar de los constantes avances en la búsqueda de nuevos tratamientos contra este padecimiento.¹

2.2 CARCINOGENÉISIS

El cáncer es una enfermedad multifactorial debido a que las combinaciones de diversos agentes son las causas que promueven su formación. Se sabe que este padecimiento es el resultado de la acumulación gradual de mutaciones genéticas que aumentan la proliferación celular. Las causas de estas mutaciones pueden ser: factores externos (ambientales); factores internos (aquellos relacionados con la genética y bioquímica de las células del paciente), **Figura 2.**²

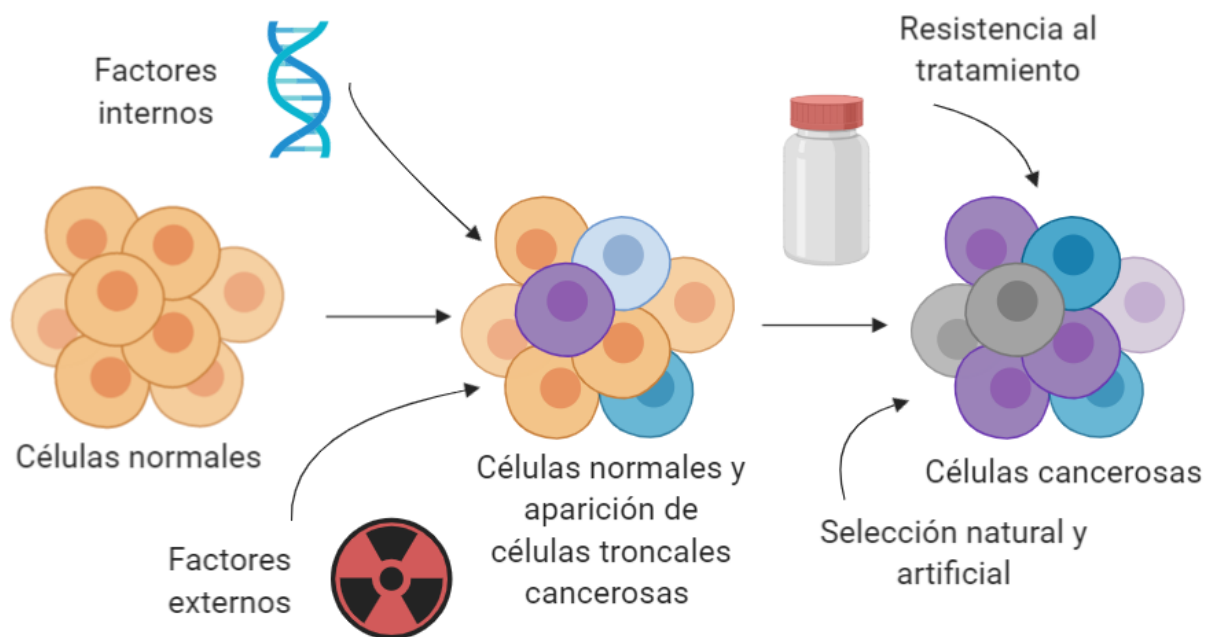


Figura 2. La carcinogénesis es un proceso multifactorial, donde los componentes genéticos (factores internos) y el medio ambiente (factores externos) influyen en la proliferación incontrolada de las células del hospedero.

2.3 ETAPAS DE LA CARCINOGENÉISIS

La carcinogénesis está dividida conceptualmente en cuatro etapas: iniciación, promoción, conversión y progresión, esto se puede observar en la **Figura 3**. Para hablar de un tumor cancerígeno se requiere la conversión de las células de neoplasia benignas (crecimiento anormal de células) a un estado maligno.³

- **Iniciación:** Esta implica cambios genéticos reversibles que se transmiten de las células madres a su progenie (mutaciones) y también cambios epigenéticos en las mismas.
- **Promoción:** Comprende la expansión clonal de las células iniciadas. Como la acumulación de mutaciones es proporcional a la frecuencia de divisiones celulares, o al menos a la frecuencia con la que las células troncales (células madre) son reemplazadas, la expansión clonal de las células iniciadas produce una población mayor de células que están en riesgo de sufrir nuevos cambios genéticos y conversión maligna.
- **Conversión:** Es la transformación de una célula neoplásica (tumoral) benigna en una que exprese un fenotipo maligno. Para este cambio se requiere que sucedan otras alteraciones genéticas.

La promoción contribuye a la expansión de una población de las células iniciadas que están en riesgo de conversión. La conversión de una fracción de estas células ocurre en proporción a la tasa de división celular, y a la cantidad de células que se dividen en el tumor benigno.

- **Progresión:** La progresión comprende la expresión del fenotipo maligno y la tendencia de células malignas de adquirir características más agresivas conforme pasa el tiempo. Algunas características del fenotipo maligno son la inestabilidad genómica y el crecimiento incontrolado. En esta etapa, otros cambios genéticos y epigenéticos pueden ocurrir nuevamente, incluyendo la activación de protooncogenes y la pérdida funcional de genes supresores de tumores.

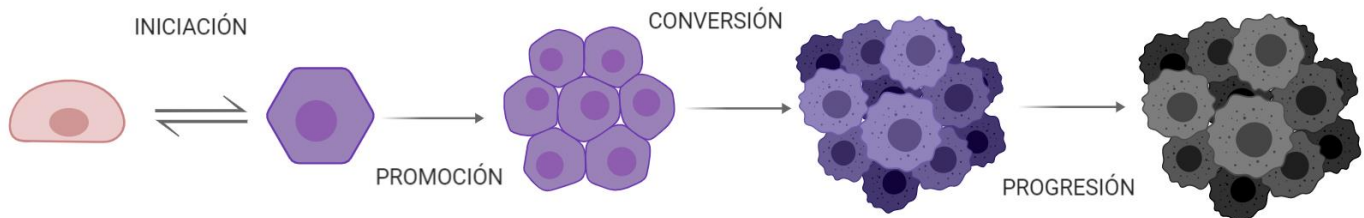


Figura 3. Etapas de carcinogénesis⁴

2.4 CÁNCER CERVICOUTERINO

Como se mencionó anteriormente, el cáncer cervicouterino es de las principales causas de muerte en las mujeres de nuestro país; éste es causado por el virus del papiloma humano (VPH). La infección causada por VPH de alto riesgo (especialmente el tipo 16) puede causar cáncer de cuello uterino, vulva, vagina, ano, y orofaringe.⁵

El VPH infecta sólo las células epiteliales y depende de la ruta de diferenciación de estas mismas para completar su ciclo de vida.⁶ En este padecimiento, la oncoproteína viral E6, promueve la proliferación celular, prolonga la progresión del ciclo celular y previene la apoptosis de las células epiteliales. E6 interacciona con productos de genes supresores de tumores, como p53 (**Figura 4**); este es un factor transcripcional que estimula la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular y apoptosis. La proteína E6 se une a p53 para su degradación a través de la vía de la ubiquitina, previniendo la apoptosis y permitiendo que las células, potencialmente transformadas, se repliquen. Lo anterior, en la vía intrínseca de la apoptosis. En la vía extrínseca, impide la formación del complejo de señalización que induce la muerte (DISC por sus siglas en inglés), induciendo a la proteína anti apoptótica (cIAP) y estimulando la degradación de la proteína asociada con Fas con el dominio de la muerte (FADD) y de la pro-caspasa 8.⁷

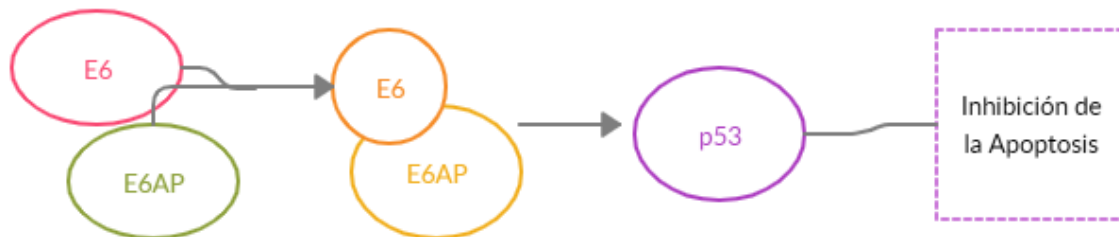


Figura 4. Inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis por E6. E6 se une a la ubiquitina ligasa (complejo E6AP) y este a su vez se une al p53 inhibiendo así la muerte celular.⁸

2.5 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte en México y a nivel mundial es la que más afecta a la población¹. Alrededor del 80-95% de los casos presenta un subtipo histológico conocido como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC); este padecimiento puede ser dividido en dos: adenocarcinoma de pulmón (LUAD) y carcinoma

de pulmón de células escamosas (LUSC). Lo que resta del porcentaje de los casos presentan otro tipo histológico denominado cáncer de pulmón de células pequeñas (Figura 5).

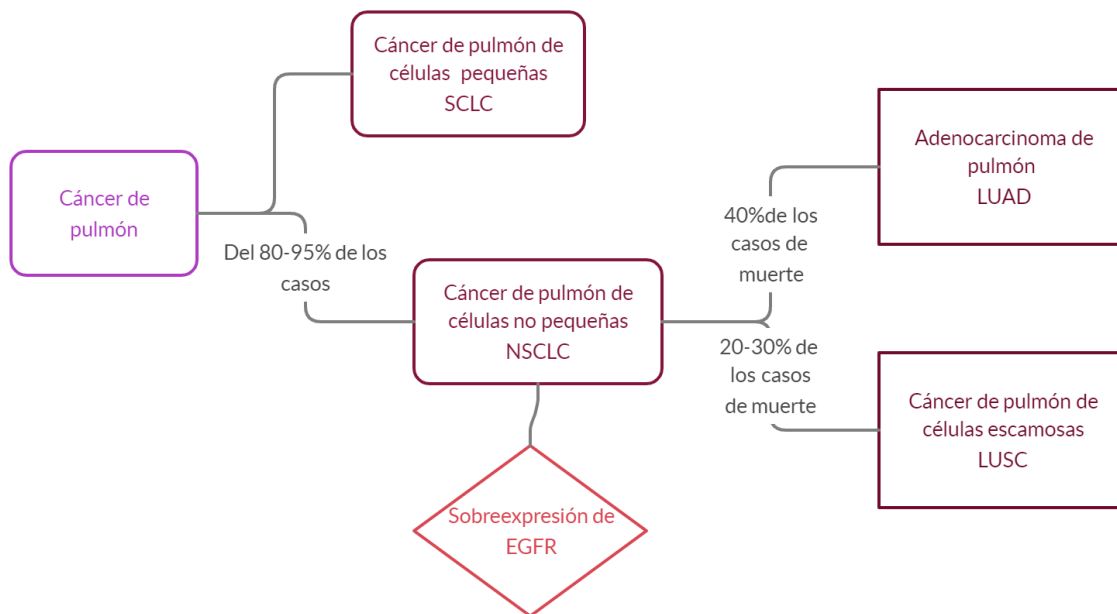


Figura 5. Tipos, subtipos y estadística sobre el cáncer de pulmón a nivel mundial ⁹

Una de las principales causas de este padecimiento es el tabaquismo, que representa más del 80% de los casos en los países donde este hábito es común. Por otro lado, en los países donde este tipo de cáncer es asociado a pacientes no fumadores puede deberse a la exposición con el medio ambiente, incluyendo la contaminación y los carcinógenos ocupacionales, así como con la genética hereditaria o predisposición.

Teniendo todo esto en cuenta, y enfocándonos en el tipo más común de cáncer a nivel mundial, el NSCLC, ha resultado difícil de tratar debido a mecanismos patológicos poco conocidos. Los avances recientes en nuestra comprensión de las vías de señalización celular que controlan la supervivencia celular han identificado aberraciones genéticas y reguladoras que suprimen la muerte celular, promueven la división celular e inducen la tumorigénesis. Uno de estos descubrimientos es el del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este receptor es una proteína tirosina quinasa transmembranal que se expresa en algunos tejidos epiteliales, mesenquimales y neurogénicos normales. La sobreexpresión de EGFR está implicada en la patogénesis de muchas neoplasias malignas humanas, como la NSCLC. Algunos estudios han demostrado que la expresión de EGFR en NSCLC se asocia con una supervivencia reducida, metástasis ganglionares frecuentes y falta de quimiosensibilidad.^{10,11}

2.6 CÁNCER COLORECTAL

El cáncer colorectal (CCR por sus siglas en español) es también una de las principales causas de muerte, tanto para hombres como para mujeres, en nuestro país. Es llamado así debido a que afecta al colon y al recto; además de que, sin importar donde aparezca primero, tienen muchas características en común.

Independientemente de la naturaleza hereditaria o esporádica de este padecimiento, diversos estudios epidemiológicos y de intervención han permitido conocer la historia natural de esta neoplasia. En este sentido, ha sido posible establecer que el adenoma o pólipo adenomatoso es una lesión premaligna que precede en la mayoría de las ocasiones a la aparición del cáncer, de manera que su extirpación reduce o incluso anula el riesgo de desarrollar esta neoplasia. Con independencia de su importancia clínica, la constatación de la secuencia adenoma-carcinoma ha sido fundamental en la caracterización de los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo del cáncer colorectal.

Existen tres vías de carcinogénesis bien caracterizadas en el CCR, la vía supresora (o inestabilidad cromosómica), la vía mutadora (o inestabilidad de microsatélites), y el fenotipo CIMP (CpG Island Methylator Phenotype por sus siglas en inglés). La vía supresora es la más frecuente y se caracteriza por la presencia de anomalías cromosómicas con pérdidas y ganancias alélicas. Estas alteraciones promueven la carcinogénesis mediante la inactivación de genes supresores de tumores (APC, SMAD4, DDC y TP53) y el aumento del número de copias de oncogenes. La vía mutadora supone una vía alternativa a la supresora, en la que el mecanismo de carcinogénesis es el acúmulo de mutaciones en el genoma por un defecto en el llamado sistema de reparación del ADN, compuesto por cuatro genes (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2). Estas mutaciones tienden a ocurrir con mayor frecuencia en secuencias repetitivas cortas del ADN (microsatélites), lo que comporta el acúmulo de mutaciones en determinados genes claves en el ciclo celular que contienen dichos microsatélites. Esta alteración molecular constituye el marcador fenotípico del síndrome de Lynch, en el que existe una mutación germinal en uno de los cuatro genes reparadores del ADN. Por último, la inactivación transcripcional mediada por metilación de las citosinas localizadas en las llamadas islas CpG del promotor de determinados genes supresores de tumores es un mecanismo importante en la carcinogénesis humana. Así, en el cáncer colorectal se ha descrito un subtipo de tumor que presenta frecuentemente hipermetilación de múltiples genes supresores de tumores, conocido como fenotipo CIMP o fenotipo metilado.

2.7 ¿QUIMIOTERAPIA O QUIMIOPREVENCIÓN?

Con respecto al tratamiento del cáncer se utiliza la quimioterapia y radiación, y en el caso del cáncer de mama también se cuenta con terapia hormonal, para tratar de erradicar esta enfermedad, pero una limitante en el tratamiento del cáncer es la resistencia a los tratamientos empleados y sus efectos adversos.

Una de las nuevas alternativas es la quimiopreención del cáncer, que se refiere al uso de agentes que inhiben o retrasan la carcinogénesis antes de la invasión. Estos agentes pueden ser clasificados en cuatro categorías: hormonales, medicamentos, agentes relacionados con la dieta o vacunas.¹²

La quimiopreención puede dividirse en diferentes tipos: las estrategias de prevención primaria buscan prevenir las neoplasias malignas de novo en una población sana. Estas personas pueden tener características de alto riesgo, como antecedentes de tabaquismo o mutaciones genéticas particulares que los predisponen al desarrollo del cáncer. La prevención secundaria involucra a pacientes que tienen lesiones premalignas conocidas, es decir, leucoplasia oral, adenomas de colon, e intenta prevenir la progresión de las lesiones premalignas hacia esos tipos de cáncer. La prevención terciaria se enfoca en la prevención de nuevas lesiones que pueden surgir del mismo tejido genéticamente alterado que el primer tumor o independientemente de un clon diferente en pacientes curados de su cáncer inicial o en individuos tratados definitivamente por sus lesiones premalignas. Los ensayos de quimiopreención se basan en la hipótesis de que la interrupción de los procesos biológicos involucrados en la carcinogénesis inhibirá este proceso y, a su vez, reducirá la incidencia de cáncer.¹³

2.8 PRODUCTOS NATURALES: UNA NUEVA ALTERNATIVA

El descubrimiento de nuevos fármacos provenientes de productos naturales es importante para la reducción de los efectos secundarios, la alta selectividad, la baja toxicidad y una mejor destrucción de las células cancerosas. A pesar del gran interés en la dieta como un modo de prevenir y curar el cáncer, no fue hasta finales del siglo XX cuando el mecanismo de acción de la quimiopreención derivada de la dieta comenzó a desmoronarse. Hace aproximadamente 35 años, el Instituto Nacional del Cáncer inició un Programa de Dieta y Cáncer para proporcionar a los investigadores los recursos necesarios para dilucidar mejor

el papel de los alimentos y sus nutrientes en la prevención del cáncer. Algunos de los estudios iniciales en el campo de la dieta y el cáncer fueron ecológicos, y examinaron las correlaciones entre las tasas de cáncer y las exposiciones a la dieta según los datos nacionales de consumo de alimentos y las tasas correspondientes de incidencia o mortalidad.

Estos estudios fueron de los primeros en demostrar que el consumo de frutas, verduras y granos integrales se asocia con una disminución del riesgo de muchos tipos de cáncer. Posteriormente, se realizaron numerosos estudios de casos y controles que dieron lugar a varios posibles constituyentes de la dieta como posibles agentes quimiopreventivos.¹⁴

Los efectos beneficiosos de las frutas y verduras se han atribuido, entre otras cosas, al alto contenido de compuestos bioactivos que son constituyentes no nutritivos comúnmente presentes en los alimentos (**Figura 6**). Los estudios realizados en las últimas décadas han demostrado que estos compuestos bioactivos tienen importantes funciones en la prevención de enfermedades crónicas, como el cáncer, la diabetes y la hipercolesteremia. Las verduras y frutas contienen fibra, vitaminas, minerales y una variedad de compuestos bioactivos, como carotenoides, aminoácidos, flavonoides, indoles y esteroides, todo lo cual podría explicar este efecto protector.¹⁵

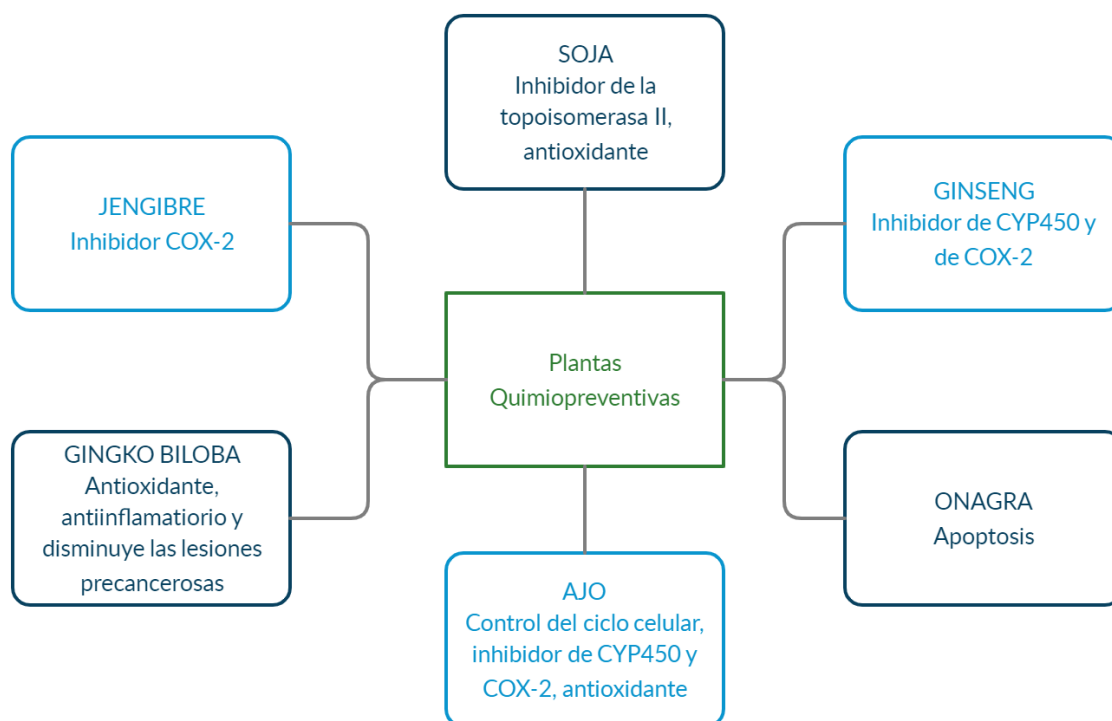


Figura 6. Algunas de las plantas que han presentado actividad quimiopreventiva y que están reportadas en la literatura.¹³

2.9 L-ESPINACINA UNA NUEVA MOLÉCULA QUIMIOPROTECTORA

En el 2016 se publicó un estudio computacional en el cual se tuvo como objetivo la búsqueda de nuevos núcleos base que presentaran posible actividad antitumoral. Se tomó la base de datos ActiProbe 2K de productos naturales y se realizó un cribado virtual el cual arrojó como resultado una molécula pequeña llamada L-espínacina la cual es un aminoácido no esencial derivado de la L-histidina que se encuentra en la espínaca.

A dicho compuesto se le determinó la actividad citotóxica en varias líneas celulares y mostró cierta selectividad hacia la línea celular SiHa (cáncer cervicouterino) la concentración citotóxica media puede observarse en la **Tabla 1**. Continuando con estos experimentos se buscó cual era la posible diana con la que este compuesto estaba interaccionando, observando que inhibe la oncoproteína E6 que produce el VPH en este tipo de cáncer.¹⁷

Tabla 1. CC₅₀ de la L-espínacina en la línea celular SiHa

Compuesto	CC ₅₀ (μM)
	SiHa
L-espínacina	268.5

Teniendo en cuenta los estudios publicados, en el grupo de investigación se realizó otro estudio computacional en el que se buscó otras posibles dianas con las que la L-espínacina puede interaccionar, se utilizó la plataforma *SwissTargetPrediction*¹⁸ la cual realiza un acoplamiento molecular inverso tomando en cuenta una base de datos de proteínas y compara la molécula que se quiere estudiar con los sustratos o fármacos que inhiben dichas proteínas.

Los resultados de este estudio arrojaron en primer lugar en cuales tipos de proteínas puede estar interaccionando el compuesto y dependiendo de cada grupo arroja una lista de específicamente qué proteínas pueden ser las posibles dianas de la molécula, en el caso de la L-espínacina en primero lugar tuvo con un 33% de probabilidad actividad sobre proteínas cinasas (**Figura 7**) y dentro de este grupo en segundo lugar de la lista posiblemente presentará actividad con el EGFR (**Tabla 2**).

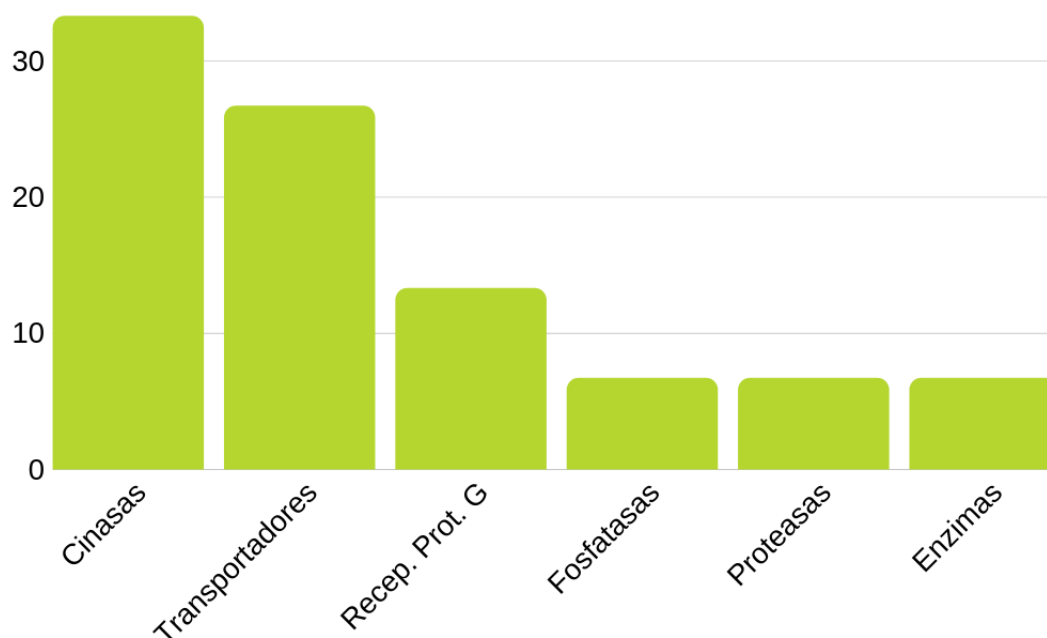


Figura 7. Predicciones de la plataforma *SwissTargetPrediction* para las posibles dianas de la L-espinacina

Tabla 2. Principales proteínas cinasas con las que puede interaccionar el compuesto L-espinacina

Prioridad	Proteína
1	Proteína cinasa 2 activada por MAP cinasas (MAPKAPK2)
2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)
3	Serina/treonina proteína cinasa PIM1
4	Cinasa dependiente de ciclina

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de muerte en México y el mundo. A pesar de que existen diversos medicamentos antitumorales disponibles en el mercado, estos no son selectivos y, en algunos casos, son poco eficaces.

La búsqueda de terapias dirigidas es importante para reducir los efectos adversos y atacar específicamente al tumor canceroso, estas son ventajas que nos pueden ofrecer los productos naturales. Por ello se ha estado explorando la actividad antineoplásica en ellos. Teniendo en cuenta esta ventaja que pueden ofrecer dichos compuestos, se han investigado diversos blancos que pertenecen a rutas bioquímicas esenciales o que son proteínas implicadas en el crecimiento y supervivencia de las células malignas.

Estudios realizados con el aminoácido L-espinaquina, compuesto que se encuentra en la espinaquina, demostraron que tenía actividad citotóxica contra células tumorales de cáncer cervicouterino. Con un estudio de acoplamiento molecular inverso se mostró que este aminoácido, presenta una alta energía de unión a la oncoproteína E6. Además, se identificó como otra diana, al EGFR, que se encuentra sobre expresado en cáncer de pulmón.

Debido a la expresión del EGFR y la oncoproteína E6 en cáncer, es de interés evaluar la actividad citotóxica del aminoácido L-espinaquina en diversas líneas celulares que sobreexpresen estas proteínas o que las expresen de manera basal.

4.0 HIPÓTESIS

Considerando que el aminoácido L-espinaquina presenta actividad hacia células de cáncer cervicouterino y estudios computacionales indicaron que su acción citotóxica se debe a su interacción con la oncoproteína E6 y con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se propone que este compuesto presentará actividad citotóxica frente a otras líneas celulares malignas donde las dianas mencionadas están presentes.

5.0 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar el aminoácido L-espinacina e identificar su posible diana molecular mediante acoplamiento molecular inverso y evaluar su actividad *in vitro* en líneas celulares.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Establecer métodos para la síntesis y purificación del aminoácido L-espinacina.
2. Caracterizar estructuralmente el compuesto sintetizado por medio de técnicas espectroscópicas como espectroscopia de infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN).
3. Evaluar mediante acoplamiento molecular la interacción del aminoácido L-espinacina con la oncoproteína E6 y explorar su posible interacción con otro receptor: EGFR.
4. Realizar la evaluación en tres líneas celulares malignas y un cultivo primario para el cálculo de la concentración citotóxica 50 (CC50) mediante un análisis probit.

6.0 METODOLOGÍA

En este apartado se muestran los métodos experimentales de forma breve; sin embargo, los detalles se describen en los anexos.

6.1 SÍNTESIS DEL AMINOÁCIDO L-ESPINACINA

De acuerdo con la literatura¹⁶ se implementó el método de síntesis que toma en cuenta el equilibrio ácido base de la L-histidina y una reacción de Mannich con formaldehído, dando paso a una reacción intramolecular entre el anillo del imidazol y la imina formada previamente con el formaldehído como se observa en la **Figura 8**.

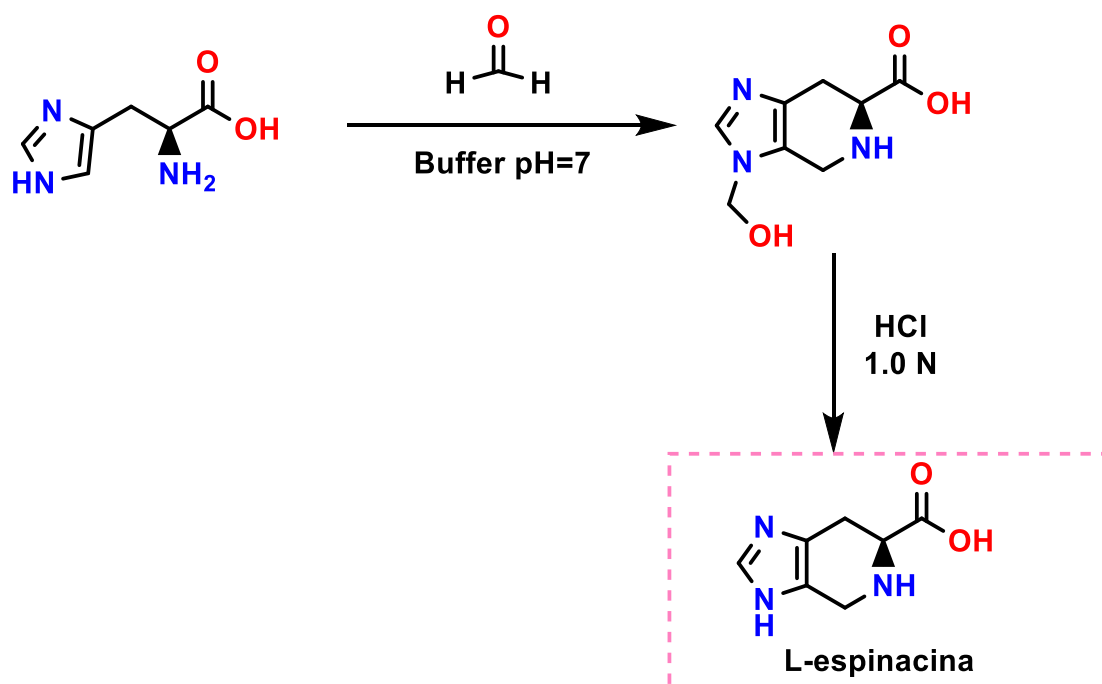


Figura 8. Esquema de reacción para la formación del compuesto L-epinacina.

6.1.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

La elucidación estructural de todos los compuestos se realizó mediante el análisis de sus espectros de infrarrojo (IR) y resonancia magnética de hidrógeno (RMN ¹H) y de carbono (RMN ¹³C). Los datos de cada técnica se indican en el **ANEXO I**.

6.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR

6.2.1 Preparación de la diana

Las dianas moleculares se descargaron del *Protein Data Bank*¹⁹ (PDB). Se prepararon con la herramienta *Structure Preparation* del programa MOE 2015.01²⁰, con ésta se corrigieron los elementos de estructura secundaria faltantes como asas y giros, se añadieron los aminoácidos incompletos y se les asignó la carga correspondiente; posteriormente, se corrigió la hibridación de los carbonos alfa de la cadena principal. Al sistema completo se le asignaron cargas parciales ocupando como campo de fuerza Amber10: EHT y se generaron los estados de protonación a pH 7.4 (± 0.1). Los parámetros considerados para la elección del PDB fueron: organismo, resolución, *R-Free* y *R-Work*.

6.2.2 Preparación del ligando

El ligando se construyó en MOE 2015.01²⁰, y se minimizó la energía mediante esta misma interfaz utilizando el campo de fuerza Amber10:EHT y se generaron los estados a pH 7.4 (± 0.1) correspondientes.

6.2.3 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se realizó en el programa LeDock²¹. Los archivos de las proteínas ya preparadas fueron cargados en la plataforma LePro del mismo programa y se adicionaron automáticamente los hidrógenos en este apartado. El tamaño y la caja para cada una de las dianas fueron realizadas por el mismo programa de acuerdo con la posición donde este detectó al ligando co-cristalizado, posteriormente en la plataforma LeDock se cargó el archivo del ligando preparado y se inició el acoplamiento.

Este programa nos arrojó los resultados en una tabla mostrando las diferentes conformaciones, el tamaño de clúster de cada una de ellas y su energía de unión de manera ascendente.

Teniendo ya estos resultados se procedió a la visualización de la conformación con mayor número de clúster y el menor valor de energía de unión en cada una de las proteínas, esto se realizó en el programa Maestro²².

6.3 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Tabla 3. Líneas celulares implementadas en este trabajo

LÍNEA CELULAR	TIPO CELULAR
SK-LU-1, A-431	ADENOCARCINOMA DE PULMÓN
HELA	CÁNCER CERVICOUTERINO
CACO-2	ADENOCARCINOMA COLORECTAL
J774	MACRÓFAGOS DE RATÓN

Se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de la L-espinacina y el control cisplatino, en las líneas celulares humanas que se pueden observar en la **Tabla 3** mediante un ensayo colorimétrico de resazurina.

Para ello, se sembraron 30,000 células/pozo en placas de 96 pozos en medio de cultivo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin. Transcurridas 2h para favorecer la adhesión de las células a los pozos, se adicionó el compuesto en un esquema de tratamiento experimental de 4 a 508 μM , se dejó en incubación a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO_2 , durante 24 o 48h. Al concluir este periodo, se adicionaron 20 μL de resazurina (2.5 mM) por pozo y se colocó nuevamente en incubación durante 4h.

Finalmente, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia, 535 nm excitación y 590 nm emisión (Fluoroskan Ascent FL, Labsystem). Se calculó el porcentaje de viabilidad de las células y se determinó la CC_{50} (Concentración Citotóxica media) mediante un análisis Probit. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado cada uno.

7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los resultados se dividirá en cuatro partes. La primera contempla la síntesis y caracterización espectroscópica del compuesto obtenido. En la segunda parte se presenta el estudio teórico del compuesto propuesto, específicamente, el acoplamiento molecular entre este y las dianas biológicas seleccionadas. La tercera parte es sobre los resultados de las pruebas biológicas y el estudio teórico del metabolismo del aminoácido sintetizado. Por último, en la cuarta sección, se presenta un nuevo estudio computacional de la interacción de la L-espinaquina con una diana molecular no considerada en la segunda parte.

7.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL COMPUESTO L-ESPINACINA

La L-espinaquina fue obtenida por un método ya reportado¹⁶ y se caracterizó mediante análisis por cromatografía en capa fina comparativa, punto de fusión (p.f.) comparativo y RMN ¹H, asignando los desplazamientos químicos (δ), constantes de acoplamiento (J) y multiplicidades correspondientes (ANEXO II).

Tabla 4. Características generales de la L-espinaquina

Compuesto	R.f.	Sistema de elución	Aspecto y color	p.f. (°C)	Rendimiento
L-espinaquina	0.55	MeOH/H ₂ O 1:1	Polvo amarillo claro	198-201	95.21%

Algo importante para considerar de este compuesto es que no absorbe en luz UV; al ser un aminoácido, este se reveló con ninhidrina en una concentración del 2% en etanol. De esta manera se puede diferenciar entre L-espinaquina y su materia prima. El fundamento de este método de identificación se encuentra en el ANEXO I.

7.1.1 L-ESPINACINA

Al realizar un análisis comparativo del espectro de infrarrojo de la L-histidina con el producto obtenido (ANEXO II), podemos observar que las dos bandas (aproximadamente en 3500 cm^{-1}) de la amina primaria de la materia prima, no se encuentran en el espectro del producto; en su lugar, sólo se observa una sola banda en 3470 cm^{-1} , característica de una amina secundaria. Esto nos habla de la formación de la L-espinaquina.

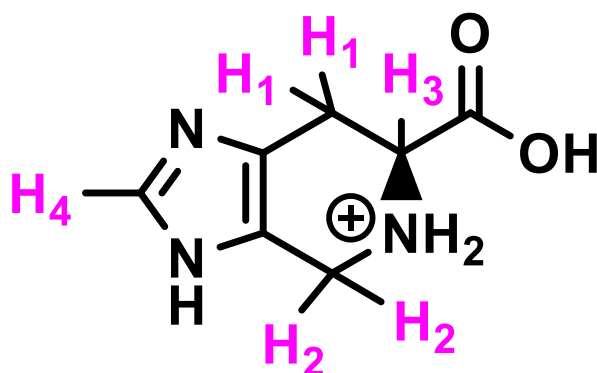


Figura 9. Estructura de la L-spinacia en la disolución de ácido Trifluoroacético en agua (ambos deuterados) a pH=2.0 para el estudio de RMN- H^1

Para el experimento del espectro de RMN H^1 , la L-spinacia se disolvió en una solución de ácido trifluoroacético en agua (ambos deuterados). En este espectro se aprecian las señales de los 4 tipos de hidrógenos de la molécula. El producto al ser un aminoácido tiene un equilibrio ácido-base por lo que se encuentra protonado en el grupo amino del anillo de piperidina. En el caso de los hidrógenos del ácido carboxílico y el grupo amino, se intercambiaron con el agua deuterada, por lo que no los observamos en el espectro.

Los hidrógenos H_1 y el H_2 son diastereotópicos, es decir, al sustituir cualquiera de ellos obtendríamos diastereómeros. En el caso de los hidrógenos H_1 la multiplicidad es de un doble de dobles debido a que sólo tienen como vecino al hidrógeno H_3 y entre ellos se acoplan con un desplazamiento de 3.3 ppm. En el caso de H_2 lo observamos en 4.55 ppm, estos se encuentran desplazados a campo bajo debido a su interacción con el grupo amino vecino y su multiplicidad de doble de dobles se atribuye a que también se acoplan entre ellos.

Para el hidrógeno H_3 podemos observar un doble de dobles a 4.98 ppm, el cual es esperado por su acoplamiento con los dos protones H_1 . Por último, para el hidrógeno H_4 del anillo de imidazol, al ser aromático, se encuentra desplazado a campo bajo (8.75 ppm), se observa un singulete debido a que no tiene hidrógenos vecinos con los que se acople.

Por otra parte, los resultados del espectro de RMN ^{13}C se pueden consultar en el ANEXO II.

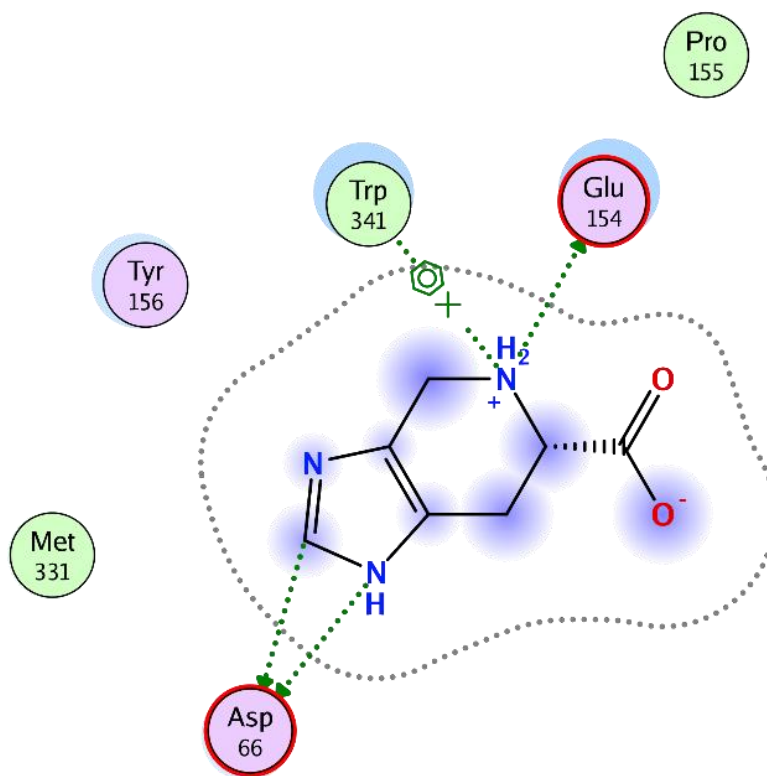
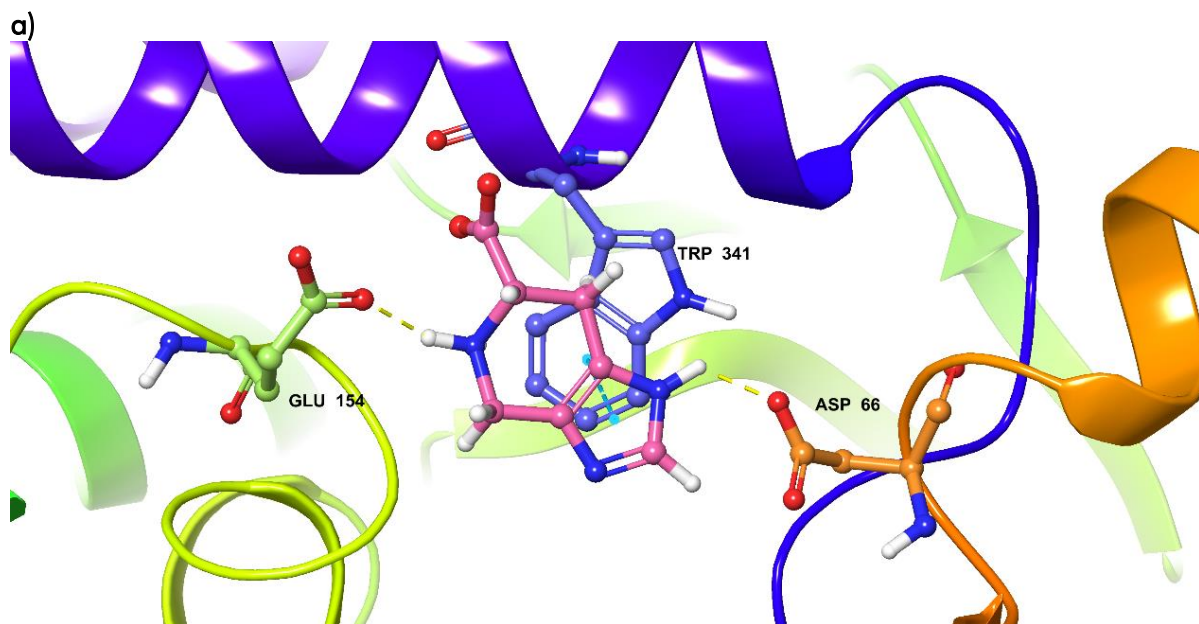
7.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR

El acoplamiento se realizó con una de las proteínas obtenidas de un *docking* inverso, en este caso EGFR. De acuerdo con lo que se encontró en la literatura, L-espinaquina presenta afinidad a la oncoproteína E6 del VPH.

La elección del sitio de unión de E6 fue con base a un inhibidor ya co-cristalizado (PDB:4GIZ) con dicha proteína. Podemos observar, en la **Tabla 5**, el valor de energía libre de unión entre esta proteína y la L-espinaquina. En la **Figura 10** podemos ver que tiene interacción con tres aminoácidos; estos son 3 puentes de hidrógeno, uno de estos, el que se mantiene con el ácido aspártico (ASP 66) existe en común con el inhibidor co-cristalizado, y una interacción π -catión entre el anillo del triptófano (TRP 341) y la carga del grupo amino del anillo de piperidina del compuesto. La energía libre de unión que tuvo este acoplamiento fue de -4.01 kcal/mol siendo el valor más bajo y con un tamaño de clúster de 78/100 esto quiere decir que es la conformación con mayor probabilidad de este estudio.

Tabla 5. Resultados del acoplamiento molecular de L-espinaquina con E6 y EGFR.

<i>Proteína</i>	<i>Score (kcal/mol)</i>	<i>Tamaño de clúster</i>
E6 (PDB:4GIZ)	-4.01	78
EGFR (PDB:1M17)	-3.98	34



b)

Figura 10. Acoplamiento molecular de L-epinefrina con E6 (PDB:4GIZ) a) representación en 3D, b) representación en 2D

Por otro lado, con el EGFR, como se observa en la **Figura 12**, se empleó dicha proteína co-cristalizada con el inhibidor erlotinib (PDB:1M17). El núcleo heterocíclico de este compuesto es una quinazolina, por lo que se realizó un alineamiento (**Figura 11**) de esta estructura con la L-espinaquina, observando que poseen similitud entre núcleos; es decir, el de la quinazolina con el de imidazol-piperidina de la L-espinaquina, tomando esto en cuenta que se utilizó como sitio de unión, donde se encuentra el inhibidor en la proteína. Se obtuvo una energía de unión de -3.98 kcal/mol, con un tamaño de clúster de 34/100, contando con un puente de hidrógeno con el ácido aspártico (ASP 831) y una interacción π -catión entre el anillo de imidazol de la L-espinaquina y la lisina (LIS 721). Tomando esto en cuenta, es posible que su modo de unión sería con el EGFR.

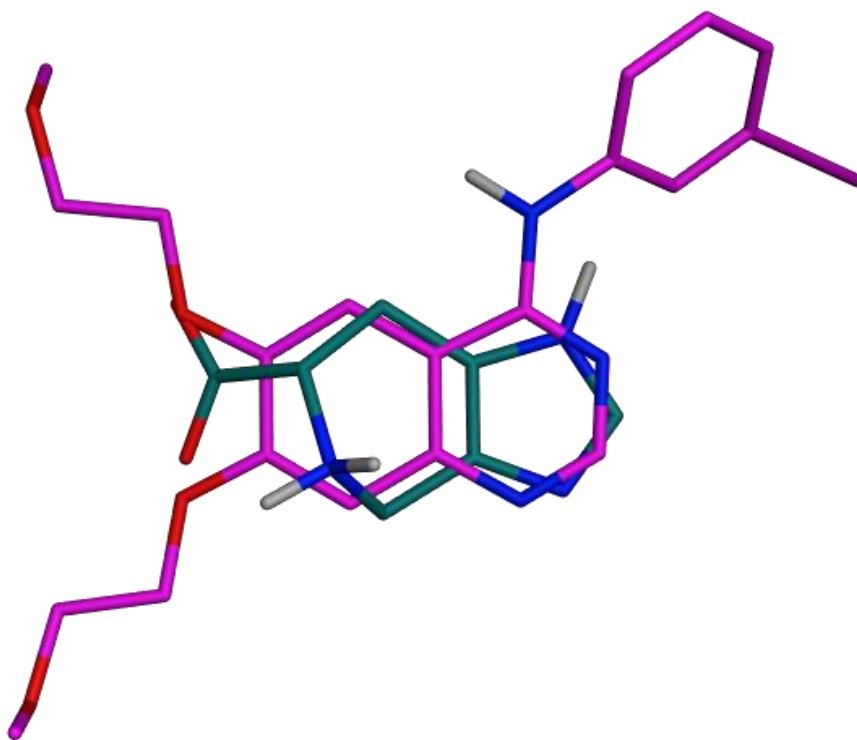


Figura 11. Alineamiento de la L-espinaquina (color verde) con el inhibidor erlotinib (color rosa)

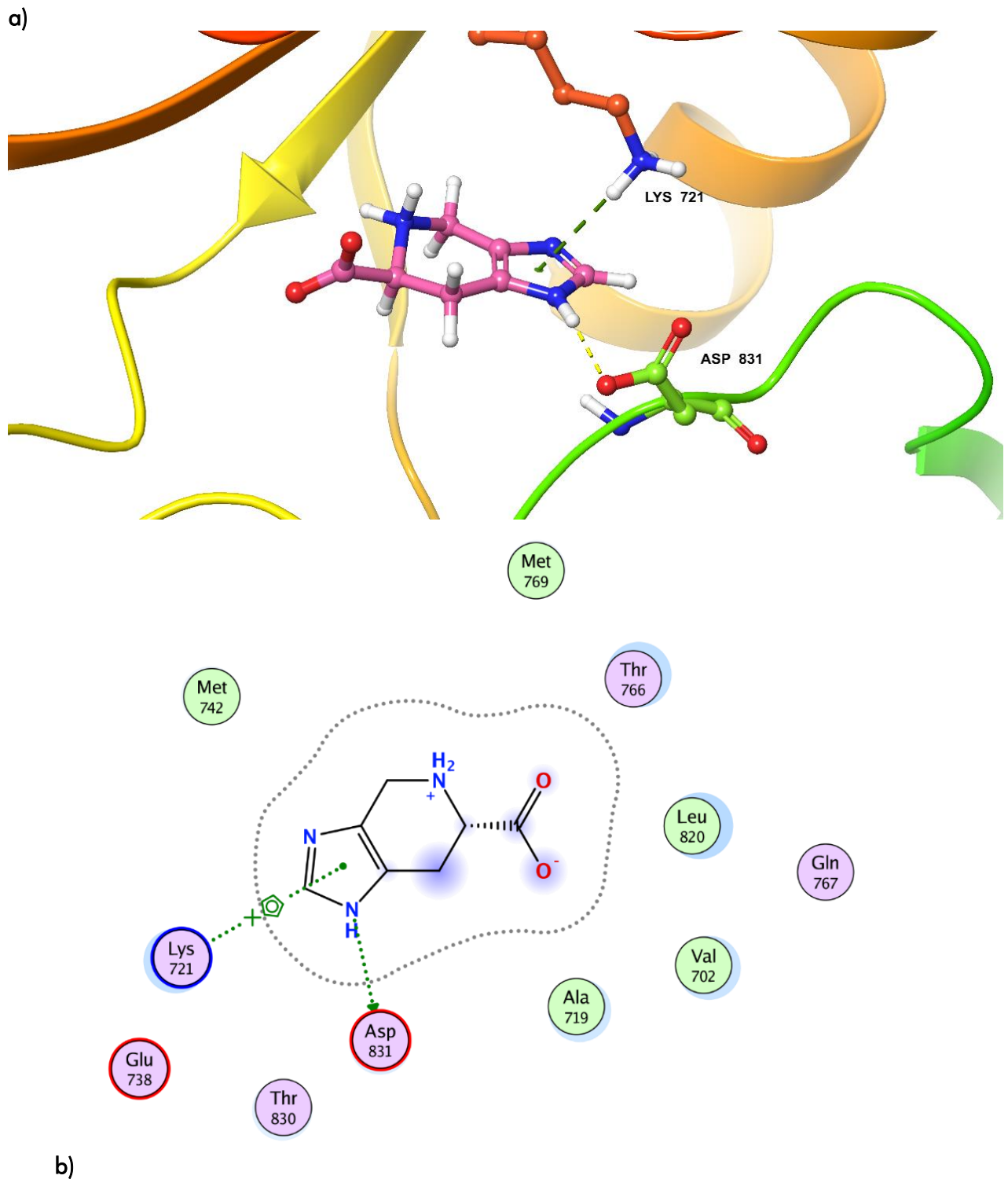


Figura 12. Acoplamiento molecular de L-espinaquina con EGFR (PDB:1M17) a) representación en 3D, b) representación en 2D

7.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS

Este apartado se dividirá en 3 partes. El primero comprende las pruebas realizadas en las líneas celulares HeLa SK-LU-1, CaCo-2 y J774, a 24 y 48 h. Después se realizará un experimento con cambio de medio a la mitad del tiempo evaluando la actividad durante 48 h. También se presenta el estudio teórico del metabolismo del compuesto. Por último, la evaluación con las líneas, A-431 y CaCo-2 por segunda ocasión.

Con el interés de analizar el efecto de L- espinacina sobre líneas celulares tumorales que expresan E6 y sobreexpresan EGFR, en este estudio se evaluó la citotoxicidad de L- espinacina sobre las líneas HeLa y SK-LU-1. Se incluyó a la línea CaCo-2 debido a que tiene expresión basal de EGFR y a la línea J774, no tumoral. En las **Tablas 6 y 7** se resumen los valores de CC_{50} (μM) de la L- espinacina y cisplatino sobre las líneas celulares mencionadas.

Tabla 6. Resultados de actividad citotóxica de L- espinacina y cisplatino en líneas celulares a 24 h.

Compuesto	CC_{50} (μM)			
	SK-LU-1	HeLa	CaCo-2	J774
L- espinacina	156.75 \pm 1.92	131.57 \pm 1.67	364.97 \pm 3.7	344.11 \pm 2.24
Cisplatino	5.23 \pm 0.43	13.10 \pm 0.64	8.70 \pm 0.46	19.5 \pm 0.50

Tabla 7. Resultados de actividad citotóxica de L- espinacina y cisplatino en líneas celulares a 48 h.

Compuesto	CC_{50} (μM)			
	SK-LU-1	HeLa	CaCo-2	J774
L- espinacina	280.91 \pm 1.80	399.32 \pm 3.4	284.21 \pm 3.66	247.36 \pm 1.62
Cisplatino	1.90 \pm 0.30	9.67 \pm 0.19	3.80 \pm 0.56	6.20 \pm 0.21

De acuerdo con la literatura, cuando el tiempo de exposición de una célula a un compuesto aumenta, la potencia citotóxica se incrementa. En el caso de la L- espinacina no fue así frente a las líneas celulares HeLa y SK-LU-1 (**Tablas 6 y 7**). En estos casos se observó una disminución de la potencia. Por el contrario, en el caso de las líneas CaCo-2 y J774, se manifestó la tendencia esperada. Finalmente, en este experimento podemos observar que el compuesto presenta selectividad para las células HeLa y SK-LU-1 con respecto a J774; situación no obtenida con Caco-2.

Retomando la actividad mostrada en las líneas HeLa y SK-LU-1 pareciera que la potencia del compuesto se pierde a las 48 h. Por lo que se decidió hacer un experimento con las mismas líneas, pero realizando un cambio de medio de cultivo a las 24h, es decir, restableciendo la concentración inicial del compuesto. Los resultados se observan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resultados de actividad citotóxica de L- espinacina y cisplatino en líneas celulares a 48 h con cambio de medio a la mitad del tiempo.

Línea celular	CC_{50} 48h (μM) con cambio de medio	CC_{50} 48 h (μM)
HeLa	288.31 \pm 1.70	347.9 \pm 1.80
SK-LU-1	119.84 \pm 1.04	283.75 \pm 1.60

Al realizar este experimento se observó que la potencia se incrementa cuando se cambia el medio. Con este experimento surgió una nueva hipótesis, la L-espinaquina puede estar siendo metabolizado antes de las 24 h, y por ello la actividad citotóxica se ve disminuida cuando no se cambia el medio.

Con esta premisa en mente, se realizó un estudio teórico, en tres plataformas en línea, que predicen la biotransformación que sufren diversas sustancias por los citocromos que se encuentran en la célula. Estas plataformas fueron SMARTCyp²³ (Figura 13), RS-WebPredictor²⁴ (Figura 14) y Xenosite²⁵ (Figura 15). Dado para el metabolismo de una molécula ocurren reacciones de fase I y fase II, siendo las primeras de oxidación-reducción, en las tres plataformas nos indican los sitios susceptibles a este tipo de reacciones. Como podemos observar en los resultados, los tres estudios señalan al carbono que se adicionó en un principio a la L-histidina para la formación de nuestro compuesto, es el punto de mayor susceptibilidad.

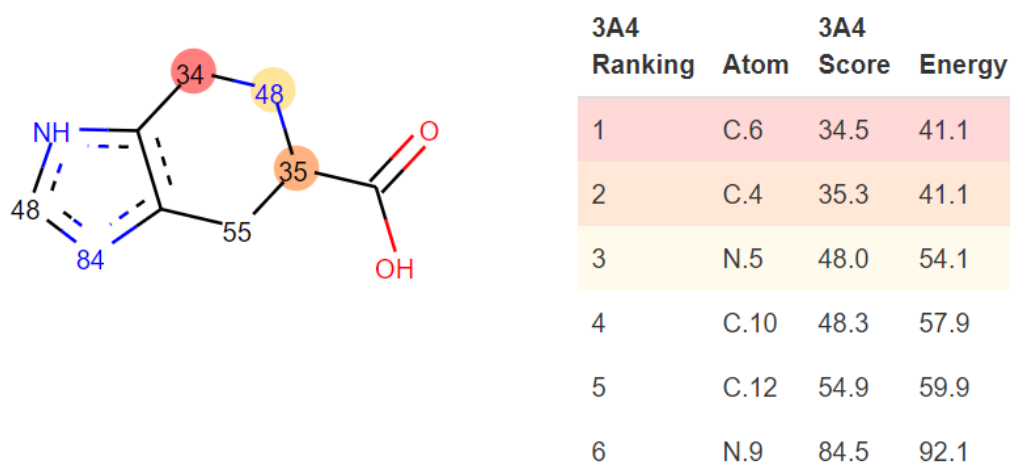


Figura 13. Resultados del estudio teórico del metabolismo de la L-espinaquina con la plataforma SMARTCyp

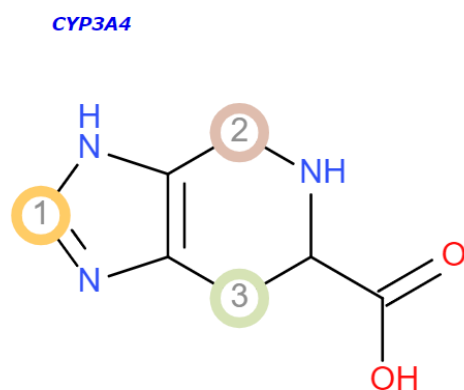


Figura 14. Resultados del estudio teórico del metabolismo de la L-espinaquina con la plataforma RS-WebPredictor

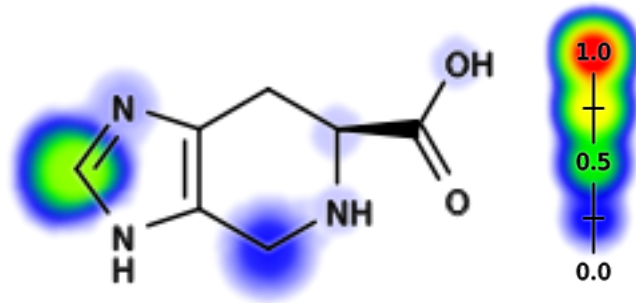


Figura 15. Resultados del estudio teórico del metabolismo de la L-espinalina con la plataforma Xenosite en CYP3A4

En la **Figura 16** se proponen los posibles productos de la biotransformación que pueden ser producidos por el metabolismo celular. Como podemos ver, puede deberse a la formación de ciertos metabolitos que ya no presentan actividad en la célula, teniendo dos teorías, con esto se podría explicar porque en el experimento a 48 h pierde la potencia del compuesto.

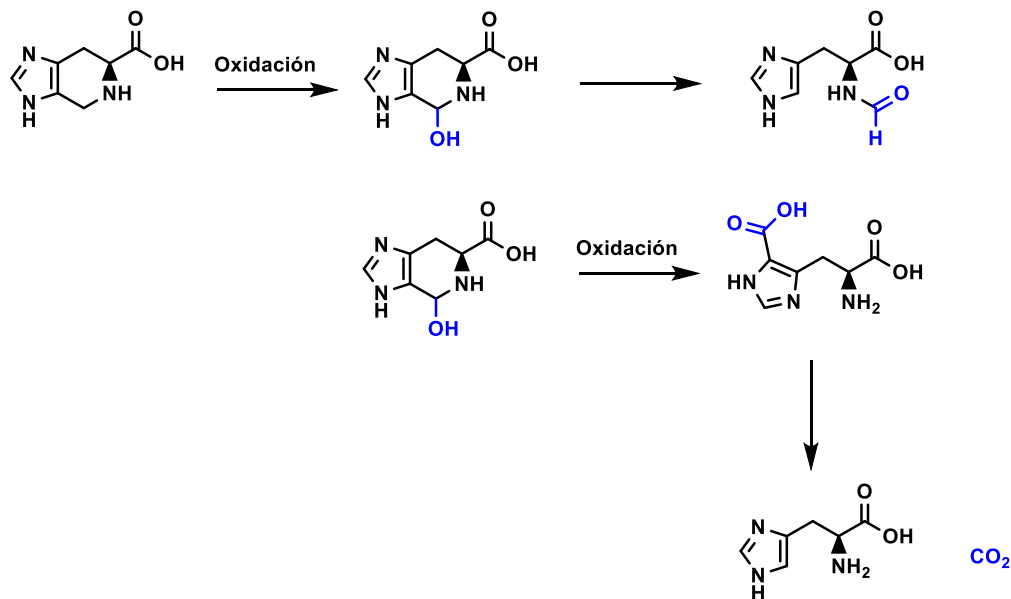


Figura 16. Posibles metabolitos derivados de la L-espinalina

Después de este estudio, se procedió a evaluar la citotoxicidad en la línea A-431, que sobre expresa una de las dianas propuestas, EGFR²⁶

Como se mencionó anteriormente, llamó la atención la actividad que tuvo el compuesto en la línea celular CaCo-2, por lo que se realizó un análisis de los posibles factores que pudieron afectar este comportamiento. Las primeras evaluaciones se realizaron en un pase 20 de la línea celular; esto es importante dado que en el grupo de investigación se ha visto que cuando una línea celular tiene ya tiempo siendo empleada va perdiendo adherencia y la expresión de algunas proteínas que pueden ser blanco de algunos fármacos. Por ello, se decidió reevaluar el compuesto, pero ahora en una línea Caco-2 con un pase 9. Los resultados de estos dos experimentos podemos observarlos en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados de actividad citotóxica de L-espinacina y cisplatino en líneas celulares a 24 h.

Compuesto	CC ₅₀ (μM)	
	A-431	CaCo-2
L-espinacina	255.61 ± 2.19	188.30 ± 3.22
Cisplatino	26.45 ± 1.4	59.50 ± 2.94

La línea celular A-431 es una línea de adenocarcinoma de pulmón y como ya se mencionó, el EGFR, una de las dianas propuestas para este compuesto. Después de realizar las evaluaciones a 24 h, debido a la hipótesis del metabolismo a tiempos prolongados, observamos que la L-espinacina presenta menor actividad en la línea A-431 que en la antes empleada del mismo padecimiento: SK-LU-1, por lo que podemos decir que la actividad de la L-espinacina no está dada por la interacción con el EGFR.

En el caso de la segunda evaluación con la línea celular CaCo-2 tomando en consideración la antigüedad de la línea celular observamos que el compuesto L-espinacina tiene una mayor potencia en comparación con el cultivo viejo; pero como ya sabemos, la actividad no está ocurriendo debido a la inhibición del EGFR. Por lo tanto, se decidió realizar una búsqueda de las proteínas sobre expresadas en esta línea con respecto al padecimiento que corresponde, en este caso, cáncer colorectal.

7.4 NUEVO ESTUDIO COMPUTACIONAL: ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE L-ESPINACINA CON MERTK

Tomando en cuenta la literatura se propuso que una posible diana que está siendo inhibida en esta línea celular es la proteína tirosin-cinasa MER (también conocida como MERTK (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER por sus siglas en inglés)²⁷. Esta proteína es producida por un proto-oncogen, esto quiere decir que si este se muta la función que tiene es promover el crecimiento celular. Cuando ocurre en una célula cancerosa hará que ésta no muera, lo cual es una de las características de este padecimiento.

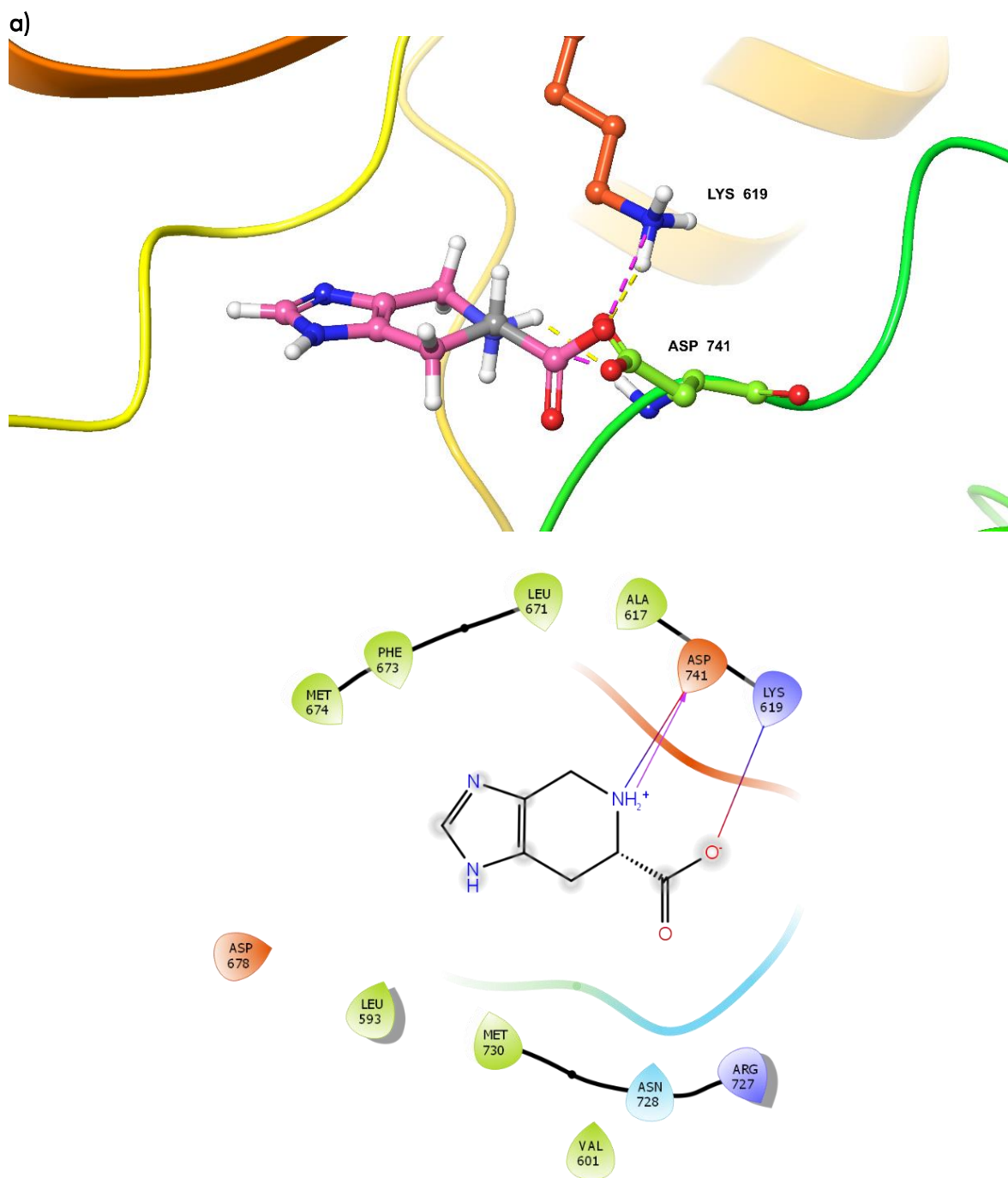
Por lo que si la L-espinacina inhibe a esta proteína también estaría inhibiendo la proliferación celular. Siguiendo la misma metodología para las anteriores dianas, se realizó el acoplamiento molecular en la proteína MERTK (PDB:3BRB) y los resultados se pueden observar en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Resultados del acoplamiento molecular de L-espinacina con MERTK.

Proteína	Score (kcal/mol)	Tamaño de clúster
MERTK (PDB:3BRB)	-5.98	62

El acoplamiento molecular arrojó como resultados un tamaño de clúster de 62/100 poses y una energía libre de unión de -5.98 kcal/mol. Se presentó la formación de 3 puentes de hidrogeno uno con la Lys619 y dos con Asp741 (**Figura 17**). Este puede ser el posible

modo de unión del compuesto a esta diana y por el cual se observa la actividad en esta línea celular.



b)
Figura 17. Acoplamiento molecular de L-espinaquina con MERTK (PDB:3BRB) a) representación en 3D, b) representación en 2D

8.0 CONCLUSIONES

Con base en los resultados del trabajo podemos decir que la L-espinaquina presenta actividad *multitarget*. Tiene selectividad hacia líneas celulares malignas, presentando escasa citotoxicidad en una línea primaria de macrófagos.

La oncoproteína E6 y MERTK son posibles dianas de esta molécula en los padecimientos de cáncer cervicouterino y cáncer colorectal.

Aunque este compuesto presenta actividad en líneas celulares de cáncer de pulmón, dicha actividad no está asociada a la inhibición del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Por los resultados anteriores, la hipótesis propuesta se rechaza dado que, aunque varios de los preceptos se cumplieron, lo referente al receptor EGFR no fue lo que se había indicado.

9.0 PERSPECTIVAS

Determinar experimentalmente si la unión de L-espinaquina es inhibidora de E6 y MERTK.

Realizar las modificaciones estructurales necesarias para aumentar la potencia citotóxica de la L-espinaquina sobre líneas celulares cancerosas.

10. REFERENCIAS

1. World Health Organization. Mexico Cancer Incidence Age-Standardized Cancer Mortality Trends Cancer Mortality Profile. (2014).
2. Society, A. C. Cancer Facts & Figures 2018. *Papermak. Conf. Proc. Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.* 233–236 (1986). doi:10.1182/blood-2015-12-687814
3. Bast, R. C. Holland-Frei cancer medicine: Multistage Carcinogenesis. *Multistage Carcinogenesis* (2003). doi:10.1002/cam4.629
4. Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M. & Mukhtar, H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1348**, 20–31 (2015).
5. Reynoso-Noverón, N. & Torres-Domínguez, J. A. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Rev. Latinoam. Med. Conduct.* **8**, 9–15 (2018).
6. Thenarasu, V. & Gurunathan, D. Human papilloma virus and cervical cancer. *Biomed.* **38**, 453–455 (2018).
7. Jave-Suárez, L. F., Ratkovich-González, S., Olimón-Andalón, V. & Aguilar-Lemarrroy, A. Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma humano. *Apoptosis Modul. by Hum. papillomavirus.* **53**, S200–S205 (2015).
8. Lizano-soberón, M., Carrillo Garcia, A. & Contreras Paredes, A. . Infección por virus del Papiloma Humano: Natural y Carcinogénesis. *Inst. Nac. Cancerol.* **4**, 205–216 (2009).
9. Figueroa, D. *Nueva Generación de quinazolininas como posibles inhibidores de EGFR para su uso como agentes antitumorales.* (2019).
10. Bethune, G., Bethune, D., Ridgway, N. & Xu, Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J. Thorac. Dis.* **2**, 48–51 (2010).
11. Liu, T. C., Jin, X., Wang, Y. & Wang, K. Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. *American Journal of Cancer Research* **7**, 187–202 (2017).
12. Shamberger, R. J. Chemoprevention of cancer. *Diet, Nutr. Cancer A Crit. Eval. Vol. II Micronutr. Nonnutritive Diet. Factors, Cancer* 43–62 (2018). doi:10.1201/9781351071383
13. Benetou, V., Lagiou, A. & Lagiou, P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. *F1000Research* **4**, 916 (2015).
14. Mehta, R. G., Murillo, G., Naithani, R. & Peng, X. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? *Pharm. Res.* **27**, 950–961 (2010).
15. Sporn, M. B. Combination chemoprevention of cancer. *Nature* **287**, 107–108 (1980).
16. Remelli, M., Pulidori, F., Guerrini, R. & Bertolasi, V. Synthesis of spinacine and

- spinacine derivatives: crystal and molecular structures of N π -hydroxymethyl spinacine and Na-methyl spinaceamine. *J. Chem. Crystallogr.* **27**, 507–513 (1991).
17. Yuan, C. H., Filippova, M., Krstenansky, J. L. & Duerksen-Hughes, P. J. Flavonol and imidazole derivatives block HPV16 E6 activities and reactivate apoptotic pathways in HPV+ cells. *Cell Death Dis.* **7**, 2012–2060 (2016).
 18. Gfeller, D. et al. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
 19. Berman, H. M. et al. The protein data bank. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 899–907 (2002).
 20. Inc., C. C. G. Molecular Operating Environment (MOE), 2015.01. 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 (2015).
 21. Liu, N. & Xu, Z. Using LeDock as a docking tool for computational drug design. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **218**, (2019).
 22. Schrödinger. Maestro | Schrödinger. *Schrödinger Release 2018-1* (2018).
 23. Rydberg, P., Gloriam, D. E. & Olsen, L. The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server. *Bioinformatics* **26**, 2988–2989 (2010).
 24. Zaretski, J. et al. RS-WebPredictor: A server for predicting CYP-mediated sites of metabolism on drug-like molecules. *Bioinformatics* **29**, 497–498 (2013).
 25. Matlock, M. K., Hughes, T. B. & Swamidass, S. J. XenoSite server: A web-available site of metabolism prediction tool. *Bioinformatics* **31**, 1136–1137 (2015).
 26. Zhang, F. et al. Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level and Binding Kinetics on Cell Surfaces by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Chem.* **87**, 9960–9965 (2015).
 27. Nguyen, K. Q. N. et al. Overexpression of MERTK receptor tyrosine kinase in epithelial cancer cells drives efferocytosis in a gain-of-function capacity. *J. Biol. Chem.* **289**, 25737–25749 (2014).
 28. Brouwer, N., Chevallier, M., Wilbie, W., Schoorl, M. & Van Pelt, J. Evaluation of 3 Point-of-Care Testing Hematology Analyzers for White Blood Count. *Point Care* **16**, 105–107 (2017).

ANEXO I: PARTE QUÍMICA

Reactivos y equipos empleados para la síntesis y purificación de la L-espinacina.

La síntesis del compuesto se realizó en el laboratorio 121, Edificio E de la Facultad de Química de la UNAM.

La materia prima y los reactivos empleados para la síntesis del compuesto presentado fue comprado a la compañía Sigma- Aldrich.

Para evaporar los disolventes (concentrar) de las mezclas de reacción se empleó un rotaevaporador IKA RV 10 digital conectado a una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 3001 vario pro.

Cromatografías

Para monitorear la reacción y verificar la pureza del intermediario y producto final se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), para ello se emplearon placas de aluminio con gel de sílice marca Merk tipo TLC silica gel 60 F₂₅₄, para revelarlas una vez eluidas con ninhidrina al 2% en etanol.

El sistema de elución con su respectiva composición fue:

Sistema MeOH/H₂O (1:1)

Al ser un aminoácido este se reveló con ninhidrina en una concentración del 2% en etanol, este compuesto reacciona con los grupos amino de la o las moléculas que se quieran observar y la tonalidad del compuesto que forma con el aminoácido es dependiente del tipo de amina que contenga la molécula, en el caso de aminas primarias este complejo es de color púrpura, aminas secundarias dan una tonalidad amarilla, en la **Figura 18** podemos observar la reacción común de una amina primaria con el indicador de ninhidrina.

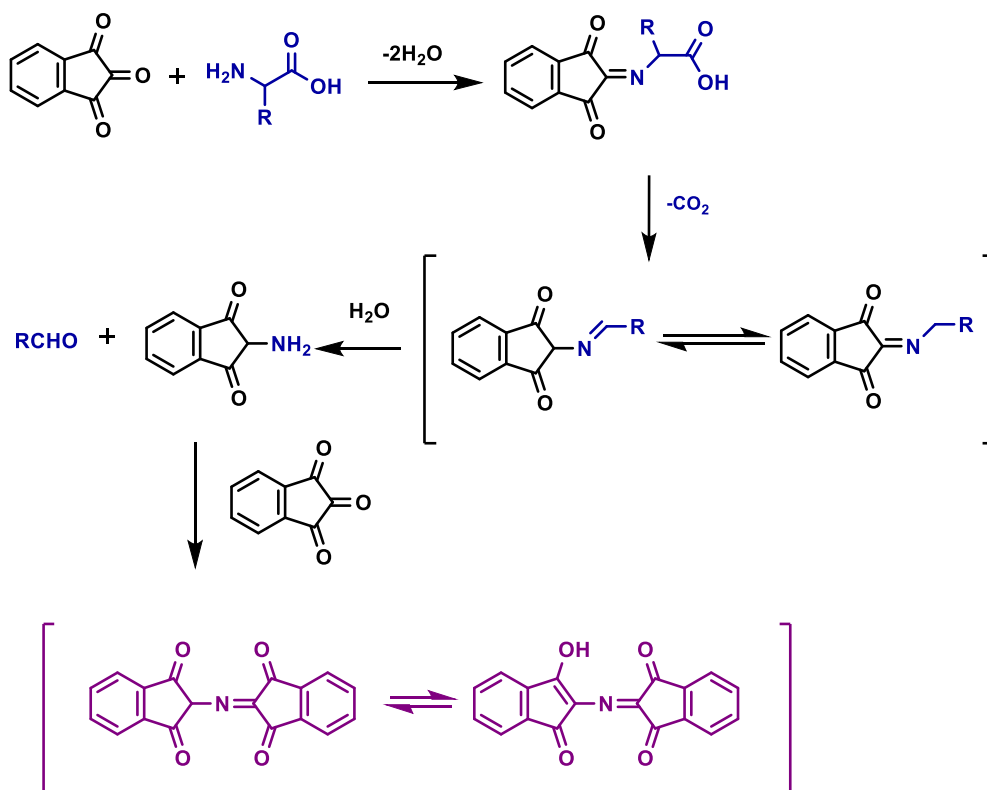


Figura 18. Reacción de la ninhidrina con un aminoácido con grupo amino primario.

Pureza del compuesto

Además de verificar la pureza del intermediario y el compuesto mediante CCF, se determinó el punto de fusión de la L-espinacina con un aparato electrothermal modelo M8144 usando capilares cerrados.

Caracterización del compuesto

Las técnicas espectroscópicas para la identificación del compuesto se emplearon equipos de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM.

En el caso de IR se empleó un espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer y para la RMN se usó un espectro de 400 MHz para hidrógeno y de 300 MHz para carbono de marca Varian modelo Unity Inova.

Síntesis de L-espinaquina

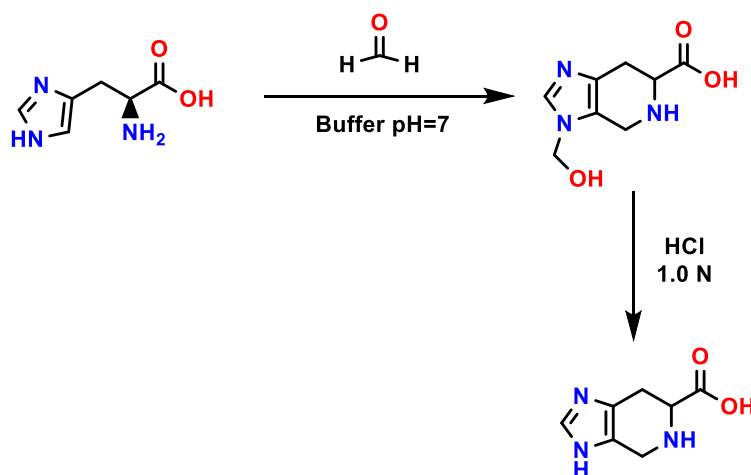


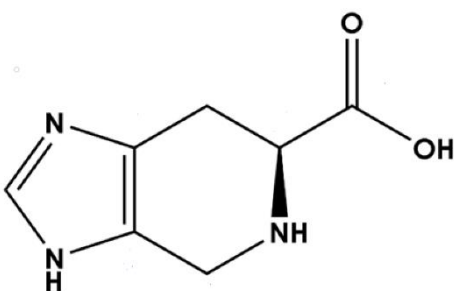
Figura 19. Reacción de formación del compuesto L-espinaquina

Se colocó en un matraz de fondo redondo de 250 mL, 1.00 g (6.45 mmol) de L-histidina al cual se le adicionaron 7.00 ml (193.35 mmol) de formaldehído en 100 mL de buffer a pH=7.00 de fosfatos a temperatura ambiente durante 6 horas, posterior a esto, se observó un precipitado blanco, que después de filtrarse se le realizaron dos lavados con éter metílico.

Transcurrido las 6 horas de reacción antes mencionadas y monitoreada por CCF se observa la formación de un solo producto, siendo este el intermediario hidroximetilado. Para la purificación del compuesto se solubilizó en una disolución de HCl 1.0 N la mezcla de reacción, posteriormente se evaporó y el precipitado se neutralizó con 5 mL de piridina en agua a pH=3.0 y se concentró dicha mezcla obteniendo un precipitado amarillo claro siendo este el compuesto esperado.

Se pesó el producto obtenido dando una masa de 1.21g (6.14mmol) teniendo un rendimiento del 95.21%.

Rf. Sistema MeOH/H₂O (1:1) P.f. 198-201°C

ANEXO II: COLECCIÓN DE ESPECTROS IR Y RMN ¹H.

L-epinacina. Masa molecular: 167.07 g/mol.
 Rendimiento 95.21% P.f: 198-201 °C. IR (ATR, v, cm⁻¹): 3470, 1575, 1643, 1404, 1282. RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ/ppm: 3.38 (m, J=17.2 Hz, 2H, H-1), 4.55 (m, J= 17.0 Hz, 2H, H-2), 4.28 (dd, J= 10 Hz, 1H, H-3), 8.75 (s, 1H, H-4). RMN ¹³C (D₂O, 300 MHz) δ/ppm: 23.08 (C-1), 40.48 (C-2), 55.76 (C-3), 122.08 (C-4), 125.87 (C-5), 137.13 (C-6), 171.21 (C-7).

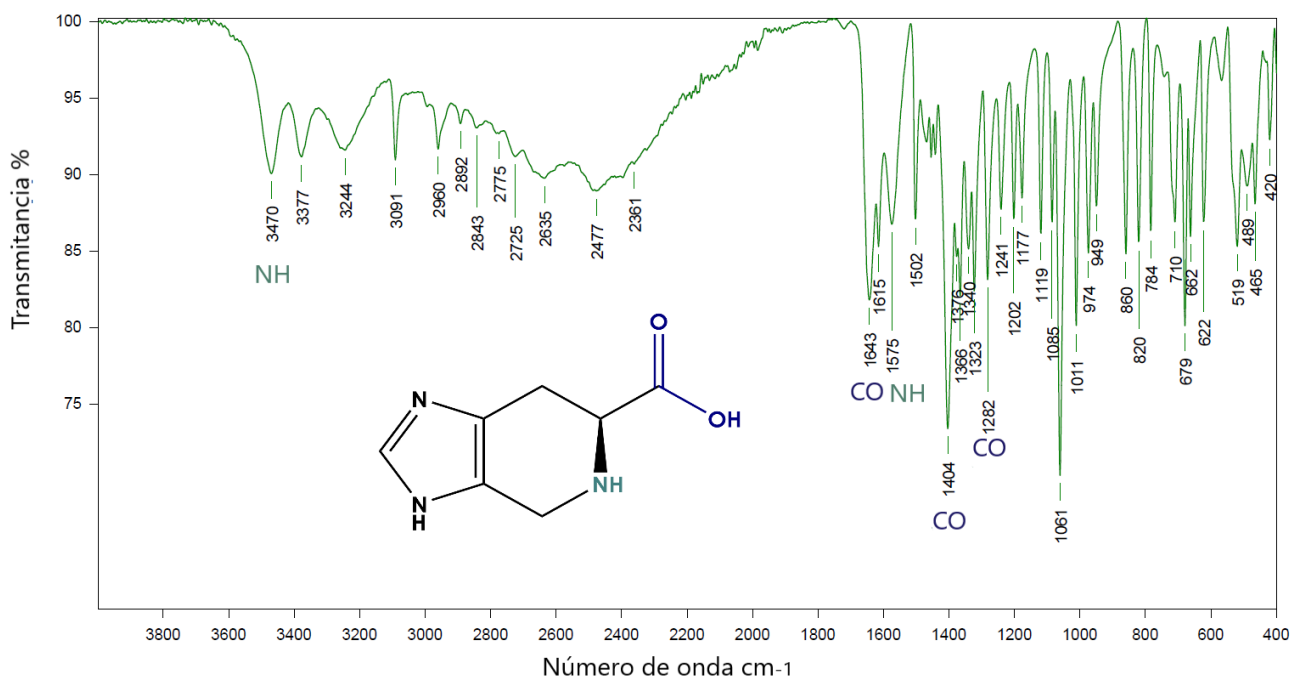


Figura 20. Espectro de IR de la L-epinacina

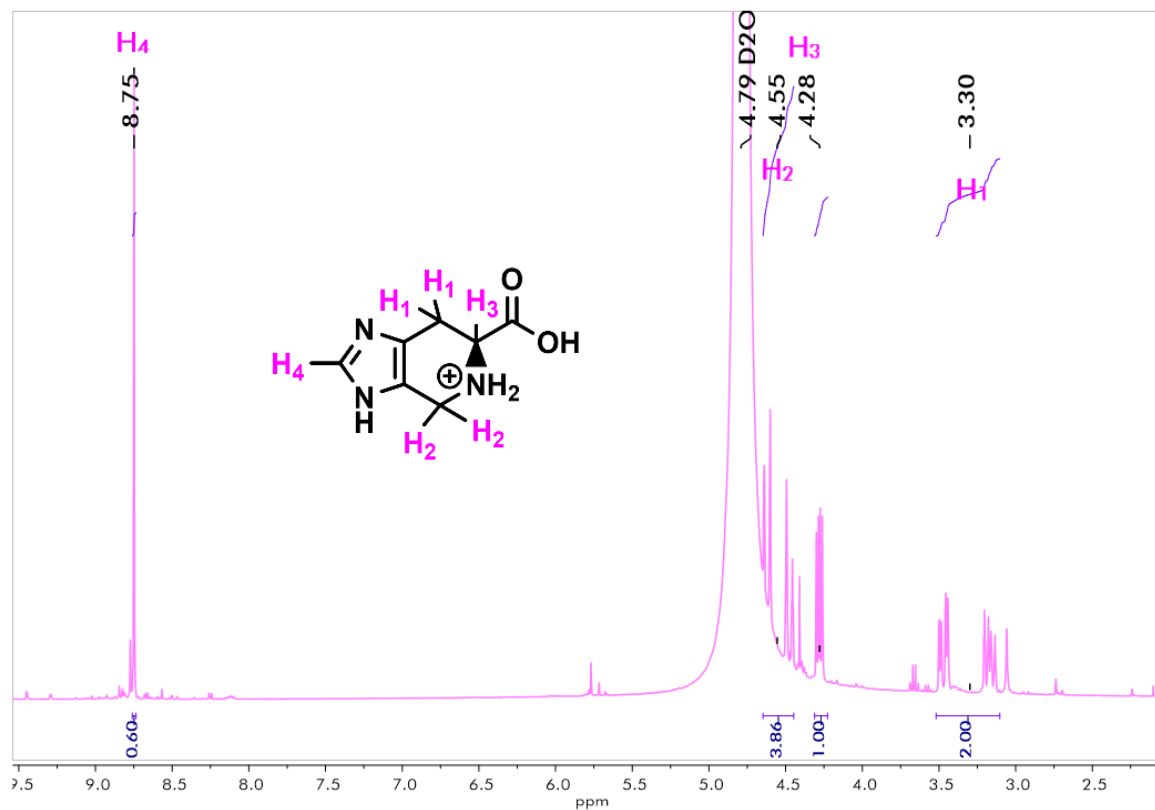


Figura 21. Espectro de RMN-¹H de la L-epinacina a 400 MHz en D₂O

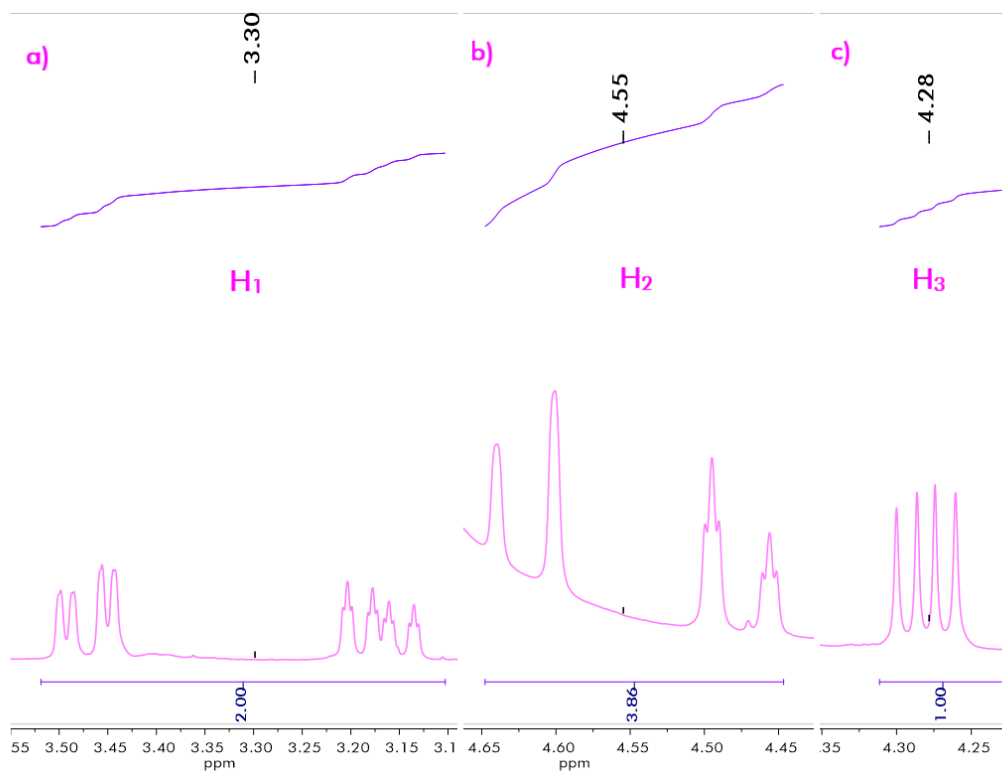


Figura 22. Espectro de RMN-¹H de la L-epinacina, a) señal para H₁, b) señal para H₂, c) señal para H₃

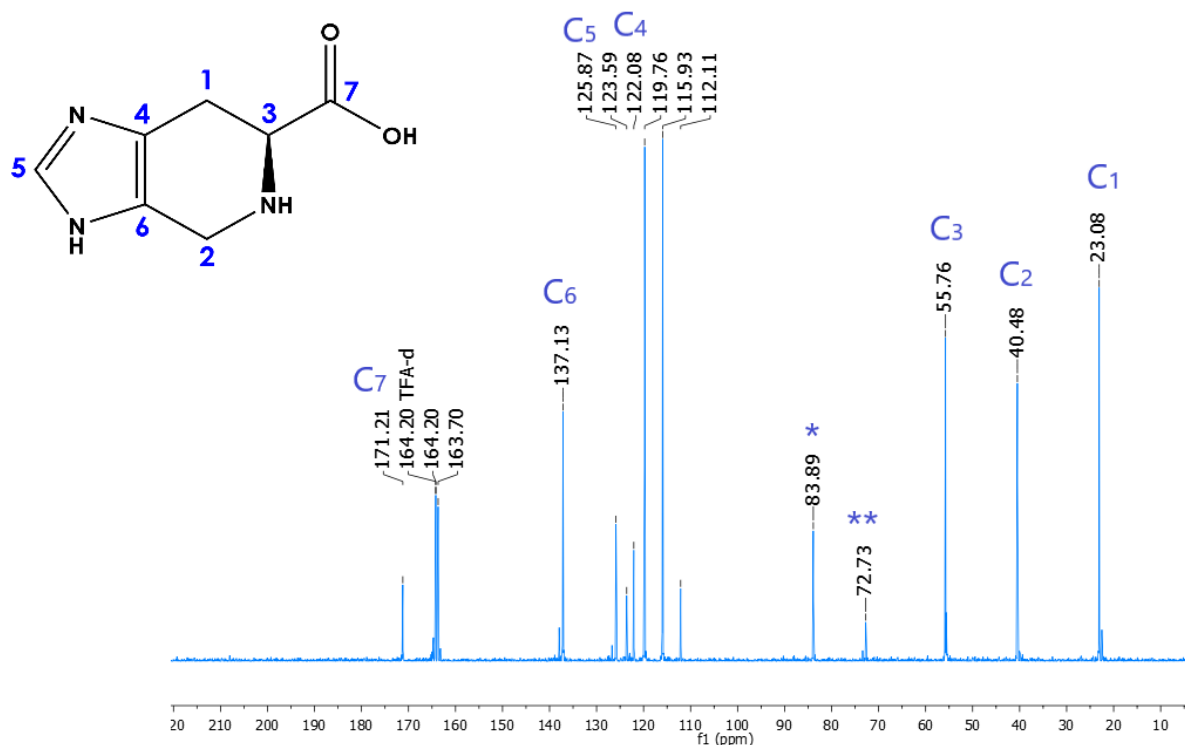
400 MHz en D₂O

Figura 23. Espectro de RMN-¹³C de la L-espinaquina a 300 MHz en D₂O
Las señales a *83.89 y **72.73 ppm se pueden asociar a formaldehído y metanol respectivamente.

ANEXO III: ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Es un método computacional basado en la estructura para el diseño de fármacos. Este método involucra la predicción de la conformación de un ligando dentro de un sitio de unión de una diana molecular. Los objetivos principales de estudios de acoplamiento es predecir de manera adecuada la conformación y la energía de unión de la molécula. Esta energía de unión se ha modelado como un equilibrio químico de formación de un complejo proteína-ligando generalmente en medio acuoso y electrolitos. A esta reacción se determina la energía libre de Gibbs (ΔG) y se consideran diversos factores como estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno, energía de solvatación, desolvatación además de factores entrópicos rotacionales y traslacionales.

ANEXO IV: PARTE BIOLÓGICA

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*

Metodología experimental

La evaluación biológica de los compuestos en las líneas celulares se realizó en la Unidad de Investigación Médica den Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría CMN siglo XXI, IMSS.

Cultivo celular

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina, a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Las células se mantuvieron en crecimiento en cajas T-25 cambiando el medio de cultivo según fuera requerido, cada dos o tres días. Cabe aclarar que todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, tanto de la manipulación como los materiales empleados, y dentro de una campana de flujo laminar.

Preparación de las soluciones

La preparación de las soluciones siguientes se realizó en condiciones asépticas, es decir, en una campana de flujo laminar y utilizando material estéril.

PBS

La solución amortiguadora de fosfatos (Phosphate Buffered Saline o PBS, por sus siglas en inglés) se preparó de tal modo que los siguientes componentes tuvieran la concentración final indicada:

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM
KH ₂ PO ₄	1.76 mM
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM
Agua desionizada estéril c.b.p.	1000 mL

Cuando los compuestos se disolvieron, se aforó con agua destilada a 1000 mL y se ajustó el pH a 7.4 en caso de que fuera necesario. Para la esterilización de la disolución, se empleó un sistema de filtración con una membrana de 0.22 μ m de diámetro de poro. Se almacenó en un recipiente estéril a temperatura ambiente hasta su uso.

PBS-EDTA

La solución amortiguadora de fosfatos con EDTA (PBS-EDTA) se preparó con los componentes a la concentración final que se señala a continuación:

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM

KH_2PO_4	1.76 mM
Na_2HPO_4	10.14 mM
EDTA	1.0 mM
Agua desionizada estéril c.b.p.	1000 mL

Del mismo modo que la solución de PBS, los compuestos se disolvieron, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó con agua destilada a 1000 mL. En la esterilización se empleó un sistema de filtración con una membrana de 0.22 μm de diámetro y se almacenó en un recipiente estéril a temperatura ambiente hasta su uso.

Medio de cultivo DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium)

Para la preparación del medio de cultivo DMEM se requirió de los siguientes componentes:

DMEM alto en glucosa	10 g (1 sobre)
L-piruvato de sodio 100X	10 mL
Antibiótico 100X	10 mL
Aminoácidos no esenciales 100X	10 mL
Na_2CO_3	63.6 mM
Agua destilada estéril c.b.p.	900 mL

El contenido del sobre de medio de cultivo se disolvió en 700 mL de agua destilada estéril con agitación magnética; posteriormente, se adicionaron los demás componentes y se mantuvo en agitación. Obtenida una mezcla homogénea, se aforó a 900 mL. El medio de cultivo se esterilizó por filtración empleando una membrana de poro de 0.22 μm . Se complementó adicionando 100 mL de Suero Fetal Bobino (SFB, por sus siglas en inglés) Biowest® correspondiente al 10% del volumen final y al cual previamente se le había inactivado (56 °C/1 h). El medio de cultivo se guardó en frascos estériles a 4 °C. Como control de esterilidad se incubaron estos frascos por 48 h a 37 °C.

El medio de cultivo RPMI 1640 que se empleó en el cultivo de algunas líneas celulares fue preparado de la misma manera, pero sustituyendo el sobre de medio DMEM por uno de RPMI 1640 (GIBCO-Invitrogen®)

Medio de congelación

El medio de congelación se obtuvo de la mezcla homogénea de DMSO y medio de cultivo DMEM complementado previamente preparado al 50% de SFB. Para ello, del volumen deseado de medio de congelación el 90% correspondió al medio DMEM y el 10% al DMSO.

Solución de Resazurina (2.5 mM)

Para obtener 10 mL de la solución de resazurina se pesaron 6.3 mg de resazurina (Aldrich®) en un tubo estéril de 15 mL. Esta cantidad fue disuelta en 5 mL de PBS; posteriormente, el volumen se ajustó a 10 mL y se homogeneizó. La solución se cubrió con papel aluminio para protegerla de la luz y fue almacenada a 4 °C

Propagación de líneas celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones óptimas de incubación y cambiando constantemente el medio hasta que las células cubrían más del 90% de la superficie de la caja T-25, es decir, alcanzaron una confluencia superior al 90%. En este momento, se procedió a eliminar el exceso de células para evitar que se saturara la caja por un exceso de confluencia. Para ello, se retiró el medio de cultivo por decantación y se agregaron 3 mL de PBS-EDTA y se colocó en incubación el tiempo necesario para desprender las células, aproximadamente 5 minutos. Las cajas se observaron al microscopio para probar que las células habían cambiado su morfología. Posteriormente, se retiró la solución de PBS-EDTA por decantación y se adicionó 1 mL de medio de cultivo a 37°C; las células se desprendieron con ayuda de una micropipeta. El exceso de las células se transfirió a una caja nueva o fue eliminado, según fue necesario. SE adicionaron 3 mL de medio de cultivo y las células se distribuyeron homogéneamente por toda la caja con movimientos suaves. Finalmente, las cajas se colocaron nuevamente en incubación.

Conteo celular con cámara de Neubauer.

En el conteo celular, primero se obtuvo una suspensión celular homogénea mediante el proceso descrito en el apartado anterior para despegar las células. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer (**Figura 24**) de forma que se cubriera la parte central de la cámara; el espacio delimitado entre la cámara y el cubreobjetos es de 0.1 mm.

Se tomó una alícuota de 10 μL de la suspensión celular por cada lado de la cámara de recuento, la cual previamente se limpió con etanol al 70%. El conteo se realizó en un microscopio invertido, contando los cuadrantes del área de recuento de las células.

Para determinar la concentración de la suspensión celular (células/mL), se calculó el promedio de células por cuadrante a partir de la suma de las células contadas en los ocho cuadrantes donde se realizó el recuento y se aplicó la fórmula para el conteo de las células en la cámara de Neubauer.

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right) = \text{promedio de células} * (1 * 10^4 \text{mL}^{-1})$$

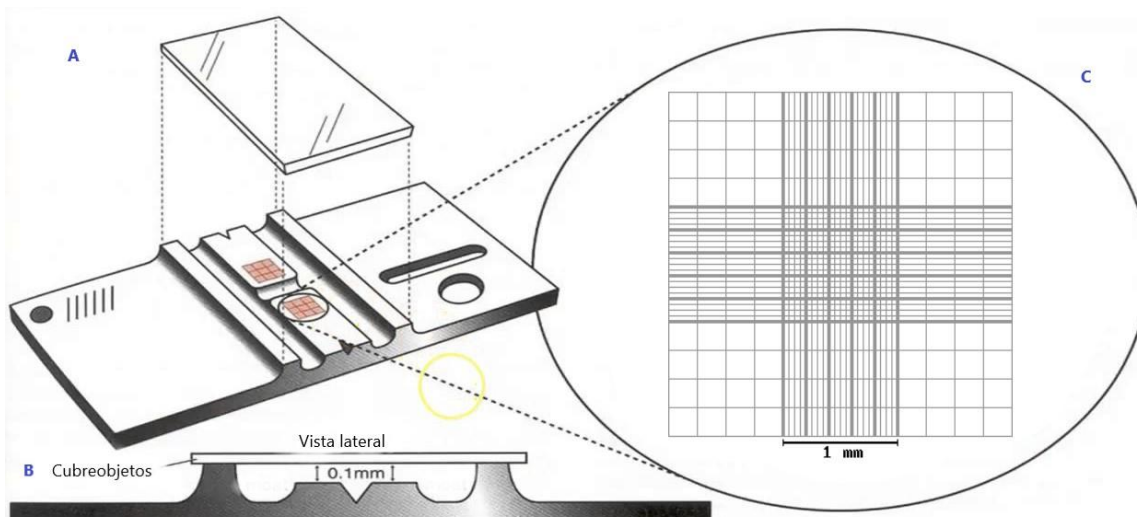


Figura 24. Representación esquemática de una cámara de Neubauer. **A** Colocación del cubreobjetos sobre las dos áreas de conteo (naranja). **B** Vista lateral de la cámara. **C** Área de conteo, se contaron los cuadrantes de las esquinas (1 mm x 1 mm) integrados por 16 cuadros no sombreados.²⁸

En el recuento es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones: primero, se cuentan únicamente las células refringentes (viables), y segundo, la concentración óptima para conteo de la cámara de Neubauer es de 10^6 células/mL; si es necesario, se debe diluir la suspensión para obtener una concentración apta para su recuento.

Procedimiento de congelación de las células.

Las líneas celulares fueron congeladas para preservarlas, se requirieron células refringentes con una confluencia superior al 90%. Las células se desprendieron con 3 mL de la solución de PBS-EDTA y la suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo de centrifugo estéril en 15 mL; cada tubo contenía un volumen máximo de 13 mL. Los tubos se colocaron durante 5 minutos a 1500 rpm; al finalizar, se retiró el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 2.5 mL de medio de congelación. Se colocó una alícuota de 1 mL de la suspensión celular a cada tubo de criogenia debidamente etiquetado. Los tubos se congelan en posición vertical a -70 °C donde son almacenados para su uso.

Procedimiento para descongelar células

Este proceso se lleva a cabo en caso de requerir células. Primero se toma una alícuota, o las necesarias, del almacén a -70 °C y se deja que se descongelen o puede acelerarse el procedimiento con un baño de agua a 37 °C, teniendo esto se colocan $500\mu\text{L}$ en una caja T-25 y se adicionan otro 5 mL del medio de cultivo y se distribuyen homogéneamente en toda la placa. Finalmente, la caja es colocada en incubación a 37 °C.

- **ANEXO V: ESTUDIO TEÓRICO DEL METABOLISMO DE LA I-ESPINACINA**

En este estudio se implementaron 3 plataformas para conocer teóricamente que es lo que pudo haber ocurrido en las pruebas de citotoxicidad. Se describirá un poco de lo que toma en cuenta cada plataforma para la evaluación computacional.

SMARTCyp²³

El servidor SMARTCyp ofrece al usuario tres formas de enviar moléculas. El usuario puede cargar un archivo en cualquier formato estándar, ingresar cadenas SMILES que representen moléculas o dibujar una molécula. Los resultados se muestran directamente en el navegador e incluyen la estructura molecular y una tabla de clasificación de átomos para cada molécula. Los tres átomos mejor clasificados se destacan tanto en la estructura como en la tabla. Además, todos los números de átomos se pueden mostrar al pasar el puntero del mouse sobre la estructura.

El algoritmo para identificar los sitios de metabolismo (sites of metabolism o SOM por sus siglas en inglés) de SMARTCyp se basa en una serie de cálculos químicos cuánticos de energías de activación de fragmentos químicos realizados en una gran cantidad de estructuras. Estos datos se compilaron en una base de datos que consta de patrones SMARTS (SMiles ARbitrary Target Specification por sus siglas en inglés) y energías asociadas. Las

estructuras de entrada se descomponen y se asocian con la biblioteca de fragmentos, las áreas de superficie calculadas y las fórmulas de regresión lineal aplicadas para proporcionar una clasificación de cada SOM.

Regioselectivity-WebPredictor (RS-WebPredictor)²⁴

Regioselectivity-WebPredictor (RS-WebPredictor) es un servidor que predice sitios de metabolismo mediado por CYP específicos de isoenzimas (SOM) en moléculas similares a diversos fármacos. Se pueden hacer predicciones para las isoenzimas promiscuas de CYP 2C9, 2D6 y 3A4, así como las CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19 y 2E1. RS WebPredictor es el primer servidor de acceso libre que predice la regio selectividad de las últimas seis isoenzimas. El tiempo de ejecución del servidor es rápido, ya que toma un promedio de 2 segundos para codificar una molécula enviada y 1 segundos para aplicar un modelo determinado, lo que permite el uso de alto rendimiento en proyectos de optimización de leads.

La salida del programa es similar a SMARTCyp con círculos de colores (rojo, naranja, verde) utilizados para indicar los tres SOM más probables en la estructura de entrada. RS-WebPredictor utiliza una combinación de 148 descriptores topológicos y las reactividades de SMARTCyp que se entrenaron mediante métodos de aprendizaje automático (una máquina de vectores de soporte) en nueve conjuntos de sustrato CYP curados manualmente para calcular los SOM para sus estructuras de entrada. Es importante tener en cuenta que RS-WebPredictor no predice si una determinada isoenzima metaboliza una molécula determinada; solo predice qué sitios se modifican suponiendo que el compuesto sea un sustrato para una isoenzima CYP dada.

XenoSite-Server²⁵

XenoSite-Server es una implementación en línea de XenoSite, es un modelo computacional que ayuda a predecir el metabolismo por CYP450. XenoSite predice qué sitios atómicos de una molécula llamados también SOM que son modificados por diversos citocromos. XenoSite-Server acepta entradas en formatos de archivos químicos comunes, incluidos SDF y SMILES, y proporciona herramientas para visualizar la probabilidad de que cada sitio atómico sea un sitio de metabolismo para una variedad de citocromos importantes, así como una descarga de archivos planos de predicciones de SOM.