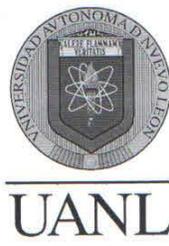


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO “*IN VITRO*” DE
ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIARÉTICO Y APORTE AL
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS MÁS ACTIVOS

Por

Q.B.P. JOSÉ ANTONIO DOMÍNGUEZ CHAVARRÍA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia

Lugar de realización:

Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Odontología, UANL

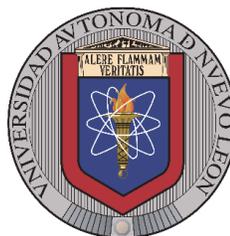
Abril 2024

i

VoBo
Dra. María del Rayo Camacho Cárdenas

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



UANL®

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO “*IN VITRO*” DE
ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIAARÉTICO Y APOORTE AL
MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO**

Por

Q.B.P. JOSÉ ANTONIO DOMÍNGUEZ CHAVARRÍA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Lugar de realización:

Laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Odontología, UANL

Julio 2024

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO “*IN VITRO*” DE
ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIAARÉTICO Y APORTE AL
MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO**

Aprobación de la tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Presidente

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Secretario

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Subdirectora de Estudios de Posgrado

Revisión y aprobación de la tesis

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO “*IN VITRO*” DE
ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO Y APORTE AL
MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO”**

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Director de Tesis

Dr. Claudio Cabral Romero
Co-Director de tesis

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Comité tutorial

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís
Comité tutorial

Dr. Isaías Balderas Rentería
Comité tutorial

<<La ciencia es de las herramientas más útiles que podemos heredar de las personas que nos transmiten este conocimiento >>

A todas esas personas que me motivaron a seguir este camino.

A cada uno de los que encontré en este camino en mi vida.

Para mi madre y hermana que nunca se rindieron conmigo, que siempre me apoyaron y me ayudaron a superarme, es un logro de ellas y mío.

A mis amigos, que a pesar de todo siguieron estando ahí para mí cuando más los necesité.

A los docentes que nunca dudaron de mí a pesar de todo, y me ayudaron a forjarme en este camino de la ciencia.

DEDICATORIA

Quiero agradecer primeramente a la vida y al destino que me permitió continuar con este trabajo para mejorar y superarme cada día.

A mi madre y hermana, siempre fueron una luz en mi vida, a pesar de los grandes momentos tan difíciles que pasé, me ayudaron nunca me dejaron solo, cuando mi salud se deterioró, ellas me ayudaron a continuar, me hicieron ver que la vida no era solo estudiar y trabajar, que también había tiempos en los que una pausa es justa y necesaria para retomar fuerzas y seguir adelante, ahora que mi salud va mejorando aún falta pero sé que con su ayuda seguiré y estaré con ellas muchos años más, las amo y mil gracias, no tengo palabras para agradecerles todo, quizás jamás se los puedo devolver en la magnitud que ellas lo hicieron pero lo intentaré. Sin duda son el motor de mi vida sin ustedes no sé qué hubiera sido de mí nuevamente las amo.

A Mario, fuiste una gran persona que se fue por un tiempo de mi vida, pero cuando regresó a mi vida, fue para bien, me has ayudado y apoyado muchísimo más que muchos de quien creía que eran mis amigos, pasaste de ser una persona que había olvidado, a ser una de las personas más importantes nuevamente en mi vida, el hecho de haberme cuidado cuando enfermé, pasar noches enteras conmigo cuidándome, sin recibir nada a cambio, cuidar a mis perros mientras no estuve para ellos, el hecho de haber ido por mí cuando mi salud empeoró y no podía conducir, con el miedo que tenías de volar aun así fuiste, estaré eternamente agradecido contigo.

A Caro, querida amiga mía, mi confidente, mi pañuelo de lágrimas, mi amiga, mi hermana, mi todo, el que estes pendiente de mi todo el tiempo, me regañes cuando es necesario, y a pesar de que sabes quién soy realmente nunca te alejaste de mí, me ayudaste a mejorar y seguir adelante, con tus platicas, tus ánimos te quiero mucha amiga.

A Orlando, amigo sabes que eres mi mejor amigo, y cuando me sentía solo, no me dejaste solo, cuando necesitaba distraerme hacías lo posible por ayudarme, tu amistad es de las más fieles que he tenido y agradezco que te toparas en mi camino, con tus locuras y risas, jamás olvidaré que me ayudaste de mil formas a seguir, te quiero a montones.

A Fanny, hermosa amiga, no solo eres mi amiga eres mi hermana, te amo mucho, no puedo decir tantas cosas porque llenaría este documento, pero sabes que me ayudaste a levantarme, de lo más profundo y comprender el sentido de la vida, y a pesar de todo nunca me has dejado ni un tantito solo, gracias por ser ese hermoso ángel que llegó a mi vida, por eso te ha ido tan bien en la vida hermosa, y te seguirá yendo bien.

A Julio, querido, a pesar de que al inicio no éramos muy amigos, con el tiempo te convertiste en una persona que aprendí a querer, y que con su calidez y locuras me hacías de un día malo en un día bueno, muchas gracias por toda la ayuda cuando te necesitaba nunca me fallaste te quiero amigo.

A mis compañeros de maestría (Diana, Roberto y Alejandro), los quiero mucho, sin ustedes el posgrado no hubiera sido lo mismo, a pesar de que todos tomamos caminos

diferentes, los sigo queriendo mucho y espero que nos encontremos nuevamente porque su amistad es única

A la Doctora Rayito, es una mentora excelente, su guía, conocimiento y paciencia conmigo fueron increíbles, a pesar de que fallé en un momento y se me salieron las cosas de control no me dejó solo, supo conservar la cordura y la paciencia, porque vio algo en mi desde un inició y no sabe cómo le agradezco por haberme ayudado tanto y no dejarme solo, es una excelente persona, y con el tiempo desarrollé un cariño muy especial por usted a parte de la relación alumno-docente.

A la Doctora Lucy, Una persona muy muy comprensiva tanto que le tomé mucho cariño durante mi estancia en el posgrado, a parte de lo académico, sus mensajes y llamadas para alentarme, y apoyarme, en todo, sabiendo que no había hecho las cosas de la mejor manera, y que cometí errores nunca dudo de mí y siempre estuvo ahí para mí, le agradezco cada minuto que se tomó por tratar de que pudiera sacar adelante lo que me propusiera.

Al comité tutorial (Dr. Abraham, Dr. Francisco y Dr. Isaías) muchas gracias comité por su apoyo y sus consejos, correcciones, sus observaciones, cada comentario que me hacían, lo tomaba para mejorar y crecer. Y por comprender que cuando hubo fallos en mi fue por causar de fuerza mayor y aun así continuaron apoyándome con este proyecto.

A mi Codirector de tesis Dr. Claudio Cabral, desde un inició, siempre fue amable y correcto, directo a lo que quería llegar con mi proyecto, y siempre accesible para los cambios, muchas gracias por retomarme como su estudiante

AGRADECIMIENTOS

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Por el tiempo invertido, asesoramiento y apoyo en la realización del proyecto

Dr. Claudio Cabral Romero

Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León

Por el apoyo brindado en la parte de cultivo celular y mecanismo de acción

Comité tutorial

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Dr. Francisco Ávalos Alanís

Dr. Isaías Balderas Rentería

Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Nuevo León

Por sus observaciones y sugerencias durante las reuniones tutoriales, seminarios departamentales y examen profesional.

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por su paciencia y apoyo para la finalización de este proyecto

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por su motivación, comentarios y felicitaciones en seminarios departamentales.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos

Por la infraestructura para la realización del presente proyecto.

Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León

Laboratorio de Biología Molecular

Por la infraestructura para la realización del presente proyecto.

CONACYT

Por la beca de manutención

RESUMEN

RESUMEN

José Antonio Domínguez Chavarría

Fecha de graduación

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO “*IN VITRO*” DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIAARÉTICO Y APORTE AL MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPUESTO MÁS ACTIVO”**

Número de páginas:

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con
Orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y método de estudio:

El cáncer es la causa de un alto índice de mortalidad en todo el mundo. El tratamiento de esta enfermedad con agentes quimioterapéuticos tiene la desventaja de que los fármacos no son específicos para células cancerosas y producen muchos efectos colaterales nocivos en los pacientes, aunado con lo anterior las células cancerosas han desarrollado resistencia a algunos fármacos usados en la quimioterapia. Los productos naturales han sido y son una fuente de nuevos fármacos ya que tienen una gran diversidad de estructuras y actividades biológicas. En el caso particular del lignano Acido *meso*-dihidroguaiaretico (*AmDG*) se reportó previamente por otros investigadores su actividad contra algunas células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*. Por lo que el propósito de este estudio fue evaluar 16

derivados del *AmDG* que se habían sintetizado y caracterizados previamente por nuestro grupo de investigación, y a los cuales se les había determinado también la actividad antibacteriana y citotóxica *in vitro*. Por lo que surgió el interés de evaluar los derivados semisintéticos que incluyen los siguientes grupos funcionales: éter, éster, carbamato, fosfato o aminoéter, los cuales se evaluaron contra cinco líneas celulares de cáncer: MCF-7 (mama), A549 (pulmón), HepG2 (hígado), HeLa (cuello uterino) y DU145 (próstata) a 25 μ M. utilizando el ensayo MTT.

Conclusiones y contribuciones:

Los resultados del cribado mostraron que dos derivados del *AmDG* tenían el porcentaje más bajo de viabilidad celular a 25 μ M, el derivado aminoéter KRM-12D y el derivado éster AV18 contra A549 ($44.15 \pm 0.78\%$) y MCF-7 ($41.60 \pm 0.92\%$), respectivamente. Luego, se determinó el valor de IC_{50} para cada compuesto frente a su línea celular cancerosa más sensible. Los resultados mostraron que el derivado de aminoéter KRM-12D mostró citotoxicidad moderada contra A549 ($IC_{50} = 17.11 \pm 2.11 \mu\text{M}$), mientras que resultó más citotóxico contra la línea celular normal de pulmón LL-47 ($CI_{50} = 9.49 \pm 1.19 \mu\text{M}$) con un índice selectividad (IS) de 0.55. Por otro lado, el derivado éster AV18 exhibió una actividad citotóxica destacable contra MCF-7 ($CI_{50} = 18.20 \pm 1.98 \mu\text{M}$), mientras que mostró una citotoxicidad moderada contra la línea celular no cancerígena de mama MCF-10 ($IC_{50} = 41.22 \pm 2.17\mu\text{M}$) con un IS de 2.2. Por lo que se determinó el mecanismo de acción del éster AV18 mediante el ensayo de LIVE/DEATH usando microscopía de fluorescencia reveló que el compuesto AV18 pudiera estar ejerciendo un mecanismo similar al de su precursor *AmDG* que consiste en la activación de la apoptosis. El derivado AV18 puede considerarse un agente anticancerígeno prometedor para futuros estudios y/o

modificaciones estructurales, ya que se requiere una mayor optimización de este compuesto para reducir toxicidad sobre las células normales y aumentar la selectividad para las células cancerosas de mama.

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Director de Tesis

Dr. Claudio Cabral Romero

Co-Director de tesis

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
1.1. El cáncer	18
1.1.1. Generalidades del cáncer y clasificación.	18
1.1.2. Epidemiología	19
1.1.3. Diagnóstico	21
1.1.4. Tratamiento y agentes quimioterapéuticos.....	21
1.1.5. Efectos adversos de la terapia anticancerígena	25
ANTECEDENTES	27
1.2. Compuestos anticancerígenos de <i>Larrea tridentata</i>	27
1.3. Obtención de Derivados Semisintéticos del AmDG	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
3.1. Hipótesis:	34
3.2 Objetivos.....	34
3.2.1 Objetivo General:.....	34
3.2.2 Objetivos Específicos:.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 Material y equipo.....	35
4.1.1. Derivados semi-sintéticos del AmDG usados en este estudio.....	35
4.1.2 Cromatografía capa fina.....	38
4.1.3 líneas celulares	38
4.1.4 Kit para ensayo de viabilidad celular MTT.....	39
4.1.5 Kit LIVE/DEAD para Viabilidad/Citotoxicidad.....	39

4.2 Metodología.....	40
4.2.1 Cromatografía Capa fina (TLC).....	40
4.2.2 Ensayo de citotoxicidad por MTT:	40
4.2.2.1 Screening de derivados semisintéticos de AmDG.....	41
4.2.2.2 Evaluación dosis respuesta (CI₅₀) de los compuestos con mayor actividad. .	42
4.2.3 Ensayo de integridad de membrana celular y citotoxicidad (LIVE/DEATH)	42
RESULTADOS Y DISCUSION	44
5.1. Análisis comparativo de resultados obtenidos en las diferentes líneas celulares de cáncer.....	44
5.2. Curva Dosis-Respuesta del Compuesto AV18 vs MCF-7 y AV18 vs MCF-10	54
5.3. Curva Dosis-Respuesta del aminoéter KRM-12D vs A549 y KRM-12D vs LL47	55
5.4. Análisis Comparativo de la eficacia del compuesto AV18 y KRM-12D (Índice de Selectividad)	57
5.5. Aporte al Mecanismo de Acción de AV18 mediante la Prueba LIVE/DEATH	58
CONCLUSIONES.....	62
PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de algunos productos naturales y derivados semi-sintéticos anticancerígenos.....	23
--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Derivados semisintéticos obtenidos del <i>AmDG</i> ;	Error! Marcador no definido.
Tabla 2. Resultados obtenidos del cribado a 25µM de compuestos en las diferentes líneas celulares cancerígenas.....	45
Tabla 3. CI ₅₀ e índice de selectividad (IS) de derivados de <i>AmDG</i>	58

ABREVIATURAS

<i>AmDG</i>	Ácido <i>meso</i> -Dihidroguaiaarético
CCF	Cromatografía de Capa Fina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Dr/Dra	Doctor/Doctora
ETC.	Etcétera
EUA	Estados Unidos de América
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
INEGI	Instituto Nacional De Estadística, Geografía e Informática
IS	Índice de Selectividad
<i>L. tridentata</i>	<i>Larrea tridentata</i>
µg	Microgramo
µM	Micromolar
MFR	Multifarmacorresistente
mL	Mililitro
MTT	Azul de Tetrazoil Tetrazolio Bromuro
OMS	Organización Mundial De la Salud
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TAC	Tomografía Axial Computarizada
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

1.1.1. Generalidades del cáncer y clasificación.

El cáncer, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), es un proceso patológico en el cual existe un desorden proliferativo a nivel celular, que produce clonas de células anormales que sobrepasa la producción de células sanas con capacidad de diseminación (OMS, 2022).

Al diseminarse las células cancerígenas, se les conoce como “tumor maligno” o “neoplasia maligna”, el cual llega a otros órganos, donde las células se “alojan” y logran una metástasis en el órgano, invadiéndolo, alterando sus funciones, a tal grado que el órgano se vuelve inútil para el cuerpo (OMS, 2022).

El cáncer suele clasificarse de varias maneras, una de las más usuales es por tipo de tejido invadido por las células cancerosas el cual se divide en 4 tipos:

- **Carcinomas:** Son aquellos que afectan a células epiteliales y son los tumores que más frecuentemente se presentan. Por ejemplo, cáncer de mama, colorrectal, próstata, etc.
- **Sarcomas:** Son aquellos que afectan al tejido conectivo del cuerpo, como sería el de hueso, cartílago, vasos linfáticos y sanguíneos.
- **Leucemias:** Es aquel tipo de cáncer que normalmente va relacionado a un cambio en médula ósea lo cual causa descontrol en el desarrollo de células sanguíneas sanas. Dentro de este destacan las leucemias linfocíticas, leucemias mieloides ya sean del tipo agudo o crónico, etc. (OMS, 2022).

- Linfomas: Es uno de los tipos de cáncer que afecta al sistema linfático del organismo, el cual es parte del sistema inmunológico y ayuda a prevenir y combatir infecciones, está constituido por ganglios y vasos linfáticos, destacando dos tipos de linfomas, el linfoma de Hodgkin y el linfoma No Hodgkin (OMS, 2022).

1.1.2. Epidemiología

Según los datos referidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es considerado la primera causa de muerte a nivel mundial, en año 2023, tan solo en el mismo año se han reportado 10 millones de defunciones provocadas por esta enfermedad. El mayor número de muertes por cáncer se localiza en los países de medio y bajo desarrollo, representando un 70% del total de los decesos.

Dentro de los tipos de cáncer que provocaron más muertes en el 2023 son: el cáncer de mama (2.28 millones), pulmón (2.23 millones, colorrectal (1.93 millones), próstata (1.41 millones), piel (1.2 millones), y gástrico (1.09 millones) (OMS 2024).

Los datos obtenidos por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI, 2023), posicionan al cáncer como la tercera causa de muerte en el país, en los meses de enero a junio del 2024 se reportó que hubo 223,196 defunciones abarcando el 56% del total de los casos, mientras que en el sexo femenino se reportaron 178,065 que corresponde al 44% por lo que los más afectados en el país son los varones. Se reportó en 2023 que durante entre los meses de enero-agosto un total de 683,823 defunciones, estableciendo la tasa de mortalidad por tumores malignos a 70 defunciones por cada 100,000 habitantes, siendo los estados de Nuevo León, Chihuahua, Sonora, Veracruz, Ciudad de México, Sinaloa y Nayarit, con las tasas de mortalidad más altas (INEGI, 2023).

Estas cifras pueden ser explicadas debido a los distintos factores de riesgo que existen para que se desarrolle un cáncer, pero lo cierto es que no existe una regla exacta que determine porque un individuo presenta cáncer y otro no. Los factores de riesgo más comunes se pueden nombrar de la siguiente manera:

- Factores ambientales y químicos: Son aquellos relacionados con el medio ambiente, por ejemplo, la contaminación de suelos, agua aire, etc., la exposición prolongada a la luz solar entre otros. Los factores químicos están relacionados a la exposición a ciertos agentes químicos como lo pueden ser, benceno, aflatoxinas, arsénico, asbesto, alquitrán entre otros.
- Los factores biológicos que se tiene más conocimiento son diversos microorganismos patógenos, que tienen la facultad de aportar un oncogén o integrar su genoma a la célula, así como activando procesos inflamatorios crónicos que pueden desencadenar la aparición del cáncer entre ellos se encuentran: el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), hepatitis B, hepatitis C, virus del papiloma humano (VPH), virus de Epstein Barr, y *Helicobacter pylori*.
- Factores relacionados al estilo de vida: los cuales involucran el estilo de vida y entorno en el que se desarrolla el individuo, por ejemplo, consumir alimentos con alto contenido de grasas, carbohidratos, hábitos de fumar, ingerir alcohol, etc.
- Factores genéticos: Son aquellos en el que el individuo ya tiene alguna predisposición genética al cáncer, ya sea por herencia o mutación al azar.
- Factores relacionados a otras enfermedades: Son aquellas enfermedades que funcionan como desencadenante de un cáncer, como lo es una inflamación crónica, como una hepatitis crónica, pancreatitis crónica etc., o aquellas enfermedades que

comprometen el sistema inmunológico causando una inmunosupresión (OMS 2020).

1.1.3. Diagnóstico

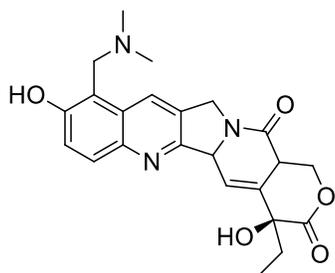
El diagnóstico del cáncer, es muy complejo y variado de acuerdo a cada caso, no existe una regla común para todos los tipos de cáncer, generalmente se comienza por la aparición de algún signo clínico lo cual lleva al médico a la realización de diversos estudios para la búsqueda de variaciones significativas en el paciente como pueden ser: bioquímica sanguínea, biometrías hemáticas, hormonales, examen general de orina, marcadores tumorales, estudios de imagen como la tomografía, resonancia magnética, ecografía, sonografías, endoscopías, también se utilizan las biopsias de alguna masa o tejido irregular observado en los estudios de imagen, o inclusive se pueden programar cirugías mediante laparoscopia exploratoria para la búsqueda más precisa, dependiendo de cada caso (Munir *et al.*, 2019).

1.1.4. Tratamiento y agentes quimioterapéuticos

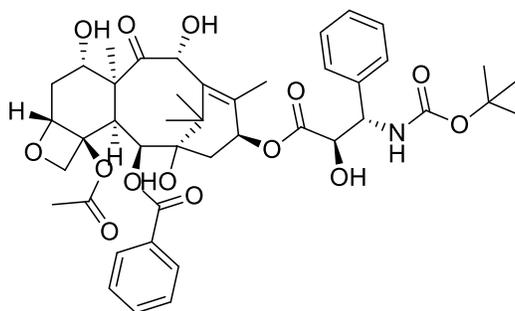
El tratamiento empleado para combatir el cáncer depende de su tipo, estadio y de las características particulares de cada paciente. En la mayoría de los casos puede ser un tratamiento único o la combinación de dos tratamientos, los cuales tienen como objetivo la reducción o desaparición del cáncer. Entre los tratamientos empleados encontramos la cirugía, la radioterapia convencional y dirigida, la quimioterapia, la inmunoterapia, la terapia génica, la terapia hormonal, el trasplante de células madre y la terapia dirigida con anticuerpos entre otras terapias. Los tratamientos más empleados son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía de forma individual o en combinación.

La mayoría de los medicamentos que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer, dañan o inhiben la replicación del ADN. Por tanto, estos medicamentos no sólo son tóxicos para las células cancerosas, sino también para las células sanas, especialmente para aquellas que experimentan una división celular rápida (por ejemplo, células hematopoyéticas, células epiteliales del tracto gastrointestinal y células del folículo piloso). La acción de los medicamentos anticancerosos contra estas poblaciones de células sanas es la responsable de la mayor parte de la toxicidad asociada a estos medicamentos, y limita su efectividad en el tratamiento del cáncer (Behranvand *et al.*, 2022).

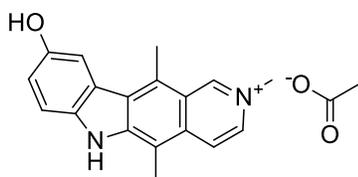
Haciendo un poco de énfasis en los agentes quimioterapéuticos (Figura 1), se sabe que varios de estos agentes usados para el cáncer provienen de productos naturales y algunos derivados semi-semisintéticos como: Eliptinium, vincristina, vinflunina, topotecán, docetaxel y taxol. (Newman & Cragg, 2020).



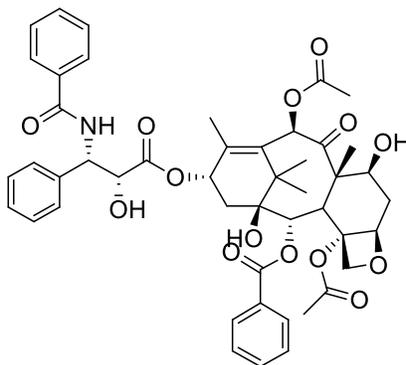
Topotecán (*Camptotheca acuminata*)



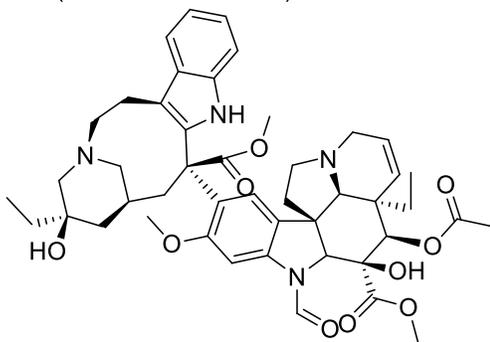
Docetaxel (*Taxus brevifolia*)



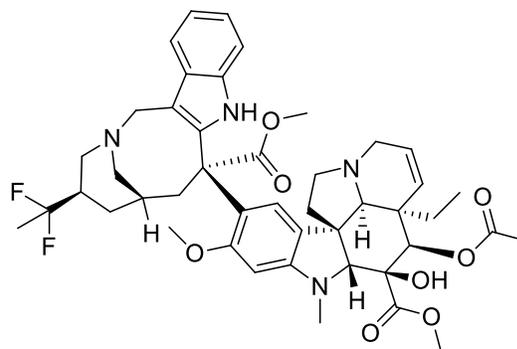
Eiptinium (*Bleekeria vitensis*)



Taxol (*Taxus brevifolia*)



Vincristina (*Catharanthus rosea*)



Vinflunina (*Catharanthus rosea*)

Figura 1. Estructura química de algunos productos naturales y derivados semi-sintéticos anticancerígenos

Por lo que se ha continuado con la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos obtenidos de las plantas medicinales, logrando aislar compuestos con estructuras tan

complejas, múltiples centros quirales y evadiendo las reglas establecidas para los fármacos comunes (Reglas de Lipinski), teniendo funciones extraordinarias, mimetizando moléculas presentes en el ser humano, llegando a ser de gran interés como dianas terapéuticas por sus diversos mecanismos de acción como lo son, inhibidores enzimáticos, modulación de receptores, interferencias con señalización celular, estimuladores del sistema inmunológico, llegando a ser útiles para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Esto ha llevado al seguimiento de estas estructuras, analizando su comportamiento en el organismo y su potencial, así como sus efectos colaterales lo que permite deducir posibles maneras de modificarlas químicamente y mejorarlas para la obtención de derivados semisintéticos y conservando gran parte de su estructura original, pero mejorando su función (Newman & Cragg, 2020).

Se ha identificado que las plantas tienen un metabolismo primario y uno secundario, siendo el primario el que sintetiza las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos de la planta, para su manutención y funcionamiento adecuado, pero en menor cantidad sintetizan los metabolitos secundarios, que permiten darle a la planta ciertas características o propiedades. Como se mencionó anteriormente estos metabolitos pueden tener propiedades farmacológicas las cuales han sido objeto de estudio para la obtención de nuevos fármacos, de manera general éstos se pueden clasificar en: aceites esenciales, flavonoides, alcaloides, terpenos, aminas, taninos, fenoles simples, saponinas, glicósidos y mucílago (Heinrich *et al.*, 2018).

Los metabolitos secundarios, son estructuralmente diferentes y complejos, existen algunas rutas metabólicas alternas para la síntesis de estos, las más conocidas y estudiadas son la ruta del ácido shikímico, la ruta del acetato malonato, acetato mevalonato, y la transformación de algunos aminoácidos (lisina, fenilalanina, tirosina y triptófano),

obteniéndose así los diferentes metabolitos secundarios de los cuales son utilizados como quimioterapéuticos para tratamiento del cáncer, así como las terapias antes mencionadas tienen como objetivo erradicar la enfermedad, pero la mayoría de ellas pueden presentar efectos adversos por ser poco selectivas. Actualmente no se cuenta con una terapia que no presente efectos adversos y que sea selectiva a células cancerosas solamente; por lo cual se sigue la búsqueda de nuevos fármacos o terapias para combatir esta enfermedad (Heinrich *et al.*, 2018).

1.1.5. Efectos adversos de la terapia anticancerígena

Los tratamientos empleados para el cáncer pueden causar efectos secundarios, los cuales ocurren cuando se afectan tejidos y órganos sanos, estos efectos pueden variar de una persona a otra y de un tratamiento a otro. Algunas personas tienen pocos efectos secundarios mientras que otras tienen más. El tipo de tratamiento, la frecuencia de este, la edad y otros padecimientos también determinan los efectos secundarios que se presentan (Nurgali *et al.*, 2018). Los efectos adversos pueden presentarse inmediatamente después del tratamiento, o en meses o años, cuando se presentan después de meses o años se les conoce como efectos adversos tardíos (Nurgali *et al.*, 2018). Los efectos secundarios más comunes causados por el tratamiento del cáncer son: problemas cardiacos, hipertensión, alteraciones pulmonares, en el sistema endocrino, en los huesos, articulaciones y los tejidos blandos, en el cerebro, medula espinal y los nervios, de salud dental, bucal y de visión, digestivos, problemas de aprendizaje, memoria y atención además de problemas emocionales, hematopoyéticos, de alopecia, cambios en la piel y uñas, etc., (Nurgali *et al.*, 2018). La mayoría de los tratamientos presentan efectos adversos y también resistencia que han desarrollado las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos. Por lo que

se siguen buscando nuevos agentes terapéuticos que sean más efectivos y selectivos y los productos naturales de plantas medicinales son una alternativa.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

1.2. Compuestos anticancerígenos de *Larrea tridentata*

Larrea tridentata (*Zygophyllaceae*) es un arbusto que crece en el norte de México y sur de Estados Unidos de América (EUA), dicha planta ha sido objeto de múltiples estudios por la gran variedad de efectos que tienen sus extractos dentro de los cuales se pueden mencionar: antioxidante, anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, antiasmática, efecto cardiovascular y antineurodegenerativa (Reyes-Melo *et al.*, 2021).

A partir de las semillas de la nuez *Myristica fragrans* se aislaron y caracterizaron cuatro lignanos entre ellos el ácido *meso*-dihidroguaiarético (Figura 2). Se ha reportado la citotoxicidad del AmDG contra ocho líneas celulares cancerígenas y una línea celular normal: H1299 (lung), H358 (lung), H460 (lung), Hela (cervical), HepG2 (liver), KPL4 (breast), MCF7 (breast), MDCK (kidney), RD (epithelial). Se observó un efecto anticancerígeno de los compuestos 1 y 2 contra la línea de cáncer de células pequeñas de pulmón H358 con un valor de Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de 10.1 y 10.2 μM, respectivamente. Además, se observó que el AmDG mostró actividad anticancerígena en el modelo de ratones portadores de tumores alogénicos dando como resultado una reducción significativa de la masa tumoral en el modelo murino (Thoung *et al.*, 2014).

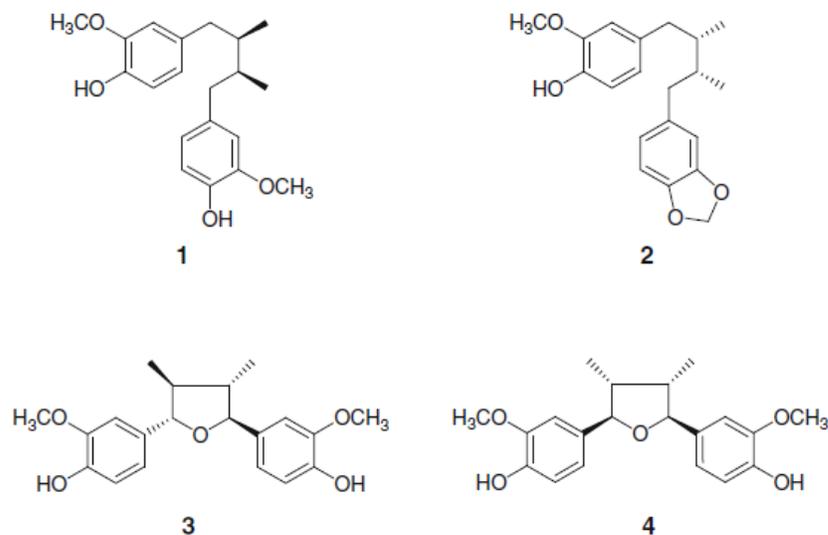


Figura 2. Lignanos aislados y caracterizados de *Myristica fragrans*

Por otro lado, se reportó que el aislamiento y caracterización estructural del *AmDG* y varios análogos, a partir de *L. tridentata*, demostraron buena actividad anticancerígena, el *AmDG* tuvo valores de I_{50} contra las líneas cancerígenas de melanoma humano (ACC375), mama (MCF-7) y de colón (SW480) con valores de CI_{50} de 7.0, 10.0 y 30.2 μM , respectivamente (Lambert *et al.*, 2005). Por otro lado, se encontró que el *AmDG* tiene efecto contra células de cáncer de mama, reduciendo la concentración del factor del crecimiento y de expresión en el ratón. Por otro lado, se observó el aumento de la concentración de la Caspasa 3 y una reducción del volumen del tumor de mama (Choi *et al.*, 2015). En otro estudio se evaluó la actividad de 3 isómeros y 4 neolignanos derivados del *AmDG* (Figura 3) en dos líneas celulares de cáncer (cervicouterino y leucemia promielocítica), en este estudio se incluyó el *AmDG*. Todos los compuestos mostraron actividad citotóxica en ambas líneas celulares. Los valores de IC_{50} del *AmDG* contra células HL-60 y HeLa fueron 26 y 29 μM , respectivamente (Yamauchi *et al.*, 2016).

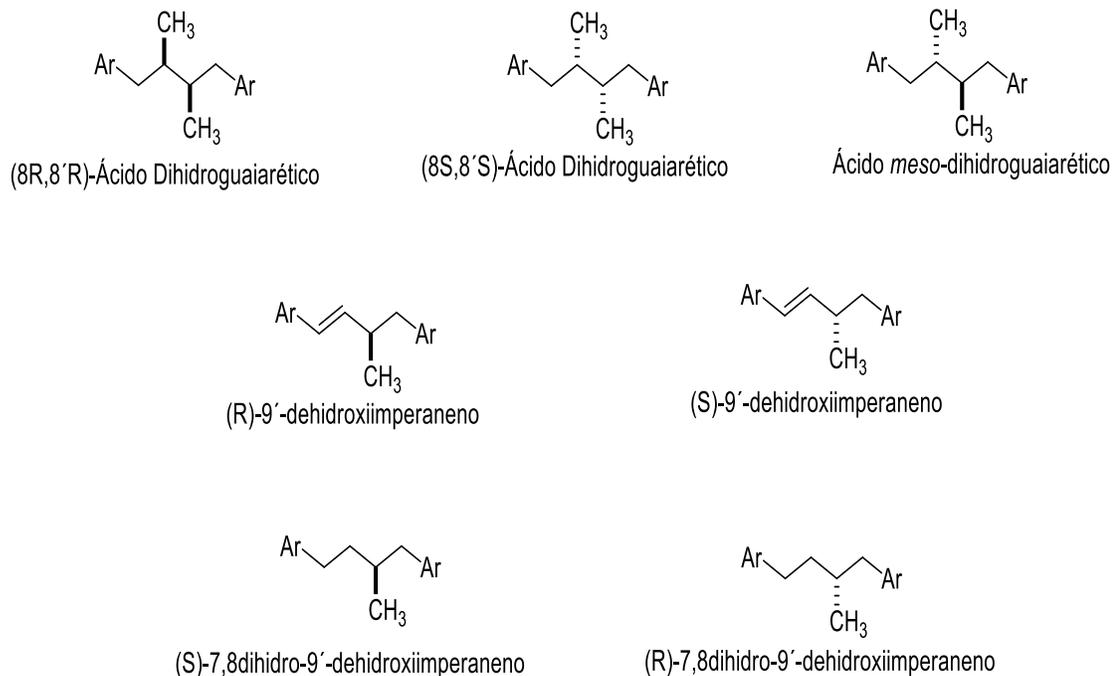


Figura 3. Estructura química de 3 isómeros y 4 neolignanos derivados del AmDG.

Ar = 4-hidroxi-3-metoxi-fenil

Siguiendo un camino similar, Izquierdo *et al.*, (2018), publicaron que los lignanos encontrados en diversas plantas como el enterodiol y la enterolactona (Figura 4). Estos lignanos ofrecen protección en la proliferación de las células cancerígenas debido a que posiblemente tienen efecto androgénico y estrogénico (Piwowarski, J. P., *et al* 2022). Este efecto es sobre todo contra algunos tipos de cánceres hormono dependientes de mama y próstata. Jeong *et al.*, 2017, demostró que el AmDG aislado de la fruta *Schisandra chinensis* tuvo efecto anticancerígeno en las células de cáncer de ovario y endometrio mediante la inducción de apoptosis dependiente de caspasas teniendo un IC₅₀ de 27.17 y 45.46 μM, respectivamente.

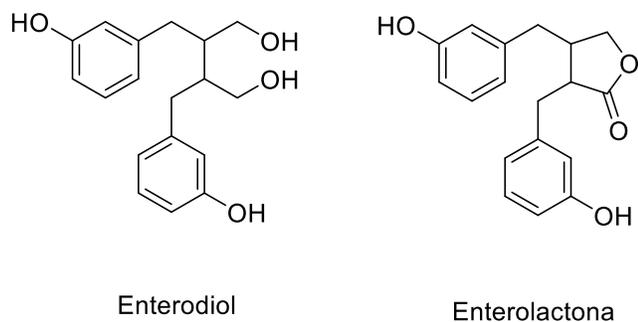


Figura 4. Estructura química de los lignanos enterodiol y enterolactona.

1.3. Obtención de Derivados Semisintéticos del AmDG

Reyes *et al.*, (2017) prepararon 33 compuestos semi-sintéticos a partir del AmDG, incluyendo: 9 aminoéteres, 2 éteres, 22 ésteres y 2 éteres. Estos compuestos fueron evaluados contra *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados mostraron que dos derivados de tipo aminoéter fueron los más activos. El derivado aminoéter 26 (Figura 5) tuvo valores de CMI en un rango de 6.25 a 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra una cepa sensible y dos MFR de *M. tuberculosis*, y no mostró citotoxicidad frente a las células Vero teniendo valores de $\text{IC}_{50} > 487\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras que un segundo aminoéter 31 fue más activo que el aminoeter 26 tendiendo valores de CMI de 3.125 y 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente contra la cepa sensible H37Rv y las 2 cepas MFR de *M. tuberculosis*, respectivamente, pero mostro leve citotoxicidad en una línea de células Vero con valor de $\text{IC}_{50} 73.23\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 5).

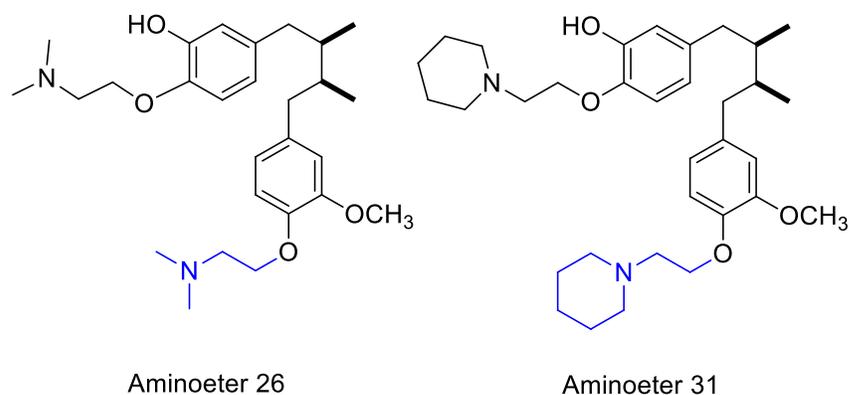


Figura 5. Derivados del AmDG activos contra *M. tuberculosis* (Reyes-Melo et al., 2017)

Por otro lado, Chávez-Villarreal *et al.*, (2018) obtuvo 19 nuevos derivados semisintéticos del AmDG incluyendo 9 carbamatos y 10 éteres. Los derivados fueron evaluados contra una cepa sensible (H37Rv) y dos aislados clínicos MFR /G122 y G133) de *M. tuberculosis*. Los resultados indicaron que el carbamato 6 fue el más activo contra una cepa de *M. tuberculosis* MFR con una CMI 12.5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el éter 14 tuvo valores de CMI en el rango de 6.25 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$ contra una cepa sensible y dos MFR de *M. tuberculosis*. Los resultados de citotoxicidad indicaron que el carbamato 6 no presentó citotoxicidad frente a células Vero $\text{CI}_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ y mientras que el éter 14 mostro una moderada citotoxicidad con un valor de IC_{50} de 13.9 $\mu\text{g/mL}$ contra las células Vero (Figura 6).

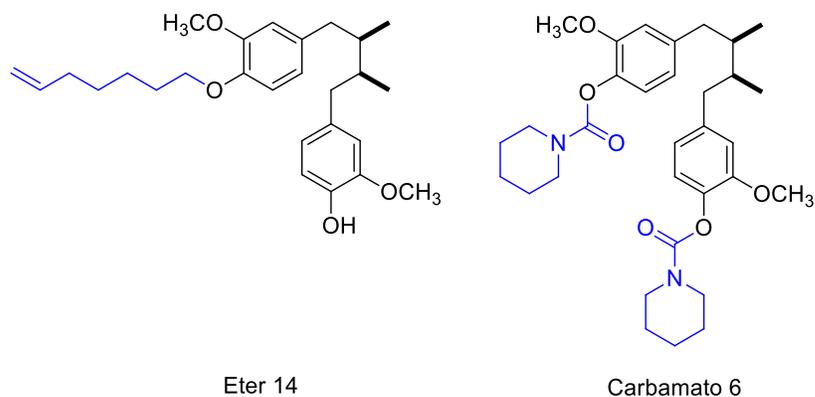


Figura 6. Derivados del AmDG activos contra *M. tuberculosis* (Chávez-Villareal et al., 2018)

Vázquez-Ramírez, 2018, sintetizó 12 derivados del AmDG, incluyendo 7 ésteres y 5 fosfatos. En este estudio se realizó la evaluación de todos los compuestos contra una cepa sensible y una MRF de *M. tuberculosis*. Dos ésteres (1 y 5) mostraron la mejor actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv, ambos ésteres tuvieron valores de CMI de 25 µg/mL, contra la cepa sensible. Cabe mencionar que se determinó su citotoxicidad contra una línea celular de macrófagos J774A.1 Los resultados indicaron que los ésteres 1 y 5 tuvieron valores de citotoxicidad moderada con valores de IC₅₀ de 21.22 y 23.26 µg/mL, respectivamente (Figura 7).

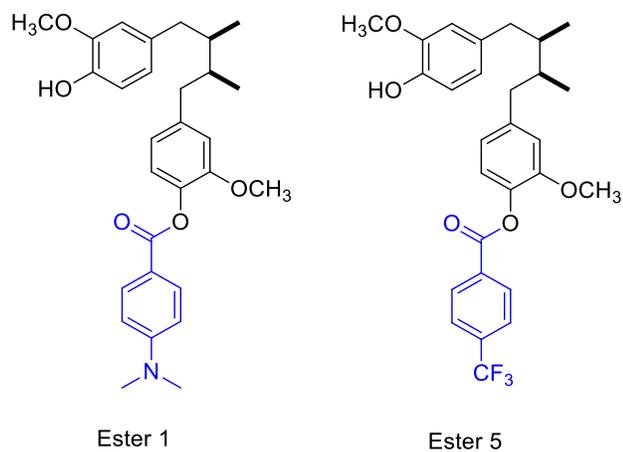


Figura 7. Derivados del AmDG con actividad contra *M. tuberculosis* (Vázquez-Ramírez, 2018).

De acuerdo con los antecedentes expuestos se plantearon la siguiente hipótesis y objetivos.

CAPITULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis:

Al menos uno de los derivados semisintéticos del *AmDG* tendrá mayor actividad anticancerígena *in vitro* que el *AmDG* y/o doxorubicina por lo menos en una de las líneas celulares de cáncer usadas en este estudio.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General:

Evaluar la actividad anticancerígena de los derivados semisintéticos del *AmDG* y aportar al mecanismo de acción del compuesto con mayor actividad anticancerígena.

3.2.2 Objetivos Específicos:

- Analizar la pureza de los derivados del *AmDG* mediante cromatografía de capa fina (TLC).
- Evaluar el efecto anticancerígeno *in vitro* de los derivados semisintéticos del *AmDG* con MTT en una concentración de 25 μ M en 5 líneas celulares (MFC-7, HepG2, DU145, A549 y HeLa)
- Realizar la curva dosis-respuesta de los compuestos que hayan presentado actividad antitumoral *in vitro* $\leq 50\%$ inhibición a 25 μ M
- Determinar la citotoxicidad en línea celular no cancerígena con MTT
- Determinar el índice de selectividad de los derivados
- Realizar el aporte al mecanismo de acción del compuesto más activo mediante la prueba de LIVE/DEATH usando microscopía fluorescente

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y Equipo.

4.1.1. Derivados semi-sintéticos del AmDG usados en este estudio.

Para el estudio de la actividad anticancerígena *in vitro* se evaluaron 16 derivados semi-sintéticos, el AmDG, y la doxorubicina como control positivo, mostrados en la Tabla 1, los cuales incluyeron: 7 Ésteres, 1 carbamato, 4 éteres, 2 aminoéteres y 2 fosfatos, que fueron obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Reyes-Melo et al., 2017; Chávez-Villareal et al., 2017; Ramírez-Vázquez., 2018). A continuación, se dan los nombres de acuerdo a la IUAPC de los compuestos evaluados y sus claves que se usaron cuando se obtuvieron los derivados semi-sintéticos.

- Molécula líder: *meso*-1,4-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-(2R,3S)-dimetilbutano (Ácido *meso*-dihidroguaiarético (AmDG))
- 1. (±)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-(2R,3S)-dimetil-4-[4-(4-bromobenzoiloxi)-3-metoxifenil]butano (KRM-1D)
- 2. (±)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-(2R,3S)-dimetil-4-(3-metoxi-4-palmitoiloxifenilo) (KRM-5M)
- 3. *meso*-1,4-bis(3-metoxi-4-palmitoiloxifenil)-(2R,3S)-dimetilbutano (KRM-5D)
- 4. *meso*-1,4-bis(3-metoxi-4-estearoiloxifenil)-(2R,3S)-dimetilbutano (KRM-6D)
- 5. *meso*-1,4-bis[3-metoxi-4-(pirazina-2-carboniloxi)fenil]-(2R,3S)-dimetilbutano(KRM-12D)
- 6. (±)-1-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-(2R,3S)-dimetil-4-(4-acetoxi-3-metoxifenil)butano (KRM-13M)

7. 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis(2-metoksi-4,1-fenileno)
bis(pirrolidina-1-carboxilato) (KCV-5D)
8. 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(but-3-eniloksi)-2-metoksibenceno]
(KCV-6D)
9. 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(hept-6-eniloksi)-2-metoksibenceno]
(KCV-8D)
10. 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[2-metoksi-1-(4-(trifluorometil)
benciloksi)benceno] (KCV-9D)
11. 4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(4-fluorobenciloksi)-2-
metoksibenceno] (KCV-11D)
12. ((2R, 3S)-2,3- dimetilbutano-1,4-diyl) bis (2-metoksi-4,1-fenilene) bis (4-
(trifluorometil) benzoato). (AV16)
13. 4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil-4-
butilbenzoato (AV17)
14. ((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoksi-4,1-fenilene) bis(4-
butilbenzoato) (AV18)
15. 4-((2S, 3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil dimetil
fosfato (AV19).
16. 4-((2R,3S)-4-(4-((dimetoxifosforil)oksi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-
metoxifenil dimetil fosfato (AV20)

A continuación, se presenta la Tabla 1 donde se puede observar los diferentes sustituyentes utilizados para la obtención de derivados monosustituídos y disustituídos del AmDG.

Tabla 1. Derivados semi-sintéticos obtenidos del AmDG y evaluados en este estudio

Sustituyentes	Derivado monosustituído	Derivado disustituído
R =		KRM-1D
R =	(±) - KRM-5M	KRM-5D
R =	(±) - KRM-6M	
R =	(±) - AV17	AV18
R =		AV16
R =		KCV-5D
R =		KCV-11D
R =		KCV-9D
R =		KCV-8D
R =		KCV-6D
R =		KRM-12D
R =	(±) - KRM-13M	

R =		(±) - AV19	AV20
-----	---	------------	------

4.1.2 Cromatografía capa fina.

La cromatografía en capa fina es una técnica que tiene como principio el uso de 2 fases, una estacionaria generalmente sólida y una fase móvil líquida. Esta técnica utiliza el principio de adsorción entre 2 fases en donde la separación se realiza de acuerdo con el coeficiente de reparto. La fase estacionaria puede ser una placa de gel de sílice con múltiples grupos hidroxilo ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), que pueden interactuar con las moléculas y la fase móvil está generalmente compuesta por solventes orgánicos, por ejemplo: hexano, tolueno, cloroformo, acetato de etilo, acetona, agua, etanol etc. (Vallejo-Rosero, Y. J., 2021)

Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó una lámina de aluminio de gel de sílice 60 F254 Merck (20 x 20 cm), con indicador fluorescente 254 nm. Además, se utilizaron como reveladores: Una Lámpara UV marca Spectroline (254nm y 365nm) y sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Como fase móvil, se utilizó una mezcla en diferentes proporciones de los solventes orgánicos de acuerdo con las propiedades estructurales de cada molécula, se utilizó la siguiente ecuación para determinar el índice de retención:

$$R_F = \frac{\text{Distancia recorrida compuesto}}{\text{Distancia recorrida solvente}}$$

4.1.3 Líneas celulares

Líneas celulares cancerígenas de estudio utilizadas de la biblioteca de American Type Culture Collection (ATCC, 2021) fueron: cáncer de mama (MFC-7), cáncer hepático

(HepG2), cáncer de próstata (DU145), cáncer de pulmón (A549) y cáncer cervicouterino (HeLa). Líneas celulares no cancerígenas utilizadas para el estudio: Células no cancerígenas de mama (MCF-10). Las líneas celulares mencionadas anteriormente crecieron a condiciones de crecimiento óptimo (37 °C, 5% CO₂), en sus medios correspondientes.

4.1.4 Kit para ensayo de viabilidad celular MTT

Para el ensayo de viabilidad celular se utilizaron los siguientes componentes del kit: *Biotium*: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT), solución salina tamponada con fosfato (PBS), doxorubicina (1,000 μM), tampón fosfato salino (PBS), dimetilsulfóxido (DMSO), microplacas de 96 pocillos y lector de absorbancia en microplaca (Hernández-Delgadillo, 2021)

4.1.5 Kit LIVE/DEAD para Viabilidad/Citotoxicidad.

Para la prueba de LIVE/DEATH para viabilidad/citotoxicidad celular se utilizaron los componentes del kit de *Thermo Fisher Scientific*: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), calceína-AM, homodímero de etidio-1 (5μM), cubre objetos estériles (0.17mm), placas de 6 pocillos, microscopio de fluorescencia utilizando filtros de isotiocianato de fluoresceína (verde) y CY5 (rojo). Barra, 5 μm.®

4.2 Metodología.

4.2.1 Cromatografía Capa fina (TLC).

Se llevó a cabo un ensayo de cromatografía en capa fina para evaluar la pureza de los derivados semisintéticos de *AmDG* en placas de TLC. Se colocaron entre 25µL a 50µL de una solución de concentración de 5µg/mL de los compuestos en las placas. Luego se dejaron secar y se corrieron con diferentes mezclas de solventes según las propiedades fisicoquímicas esperadas de cada uno, se observó cada TLC bajo luz UV de 254nm y 365nm. Posteriormente se reveló con sulfato sérico en ácido sulfúrico y se calentaron con una pistola de calor.

4.2.2 Ensayo de citotoxicidad por MTT:

En este estudio se evaluó el efecto anticancerígeno *in vitro* del *AmDG* y 16 derivados de sus derivados semi-sintéticos contra 5 líneas celulares cancerígenas (MFC-7, HepG2, DU145, A549 y HeLa), mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Este es un método colorimétrico basado en la reducción del compuesto MTT por las deshidrogenasas mitocondriales activas de las células vivas permitiendo la formación formazán color violeta el cual es cuantificable a una longitud de onda de 570nm. La metodología se realizó como lo describió Hernández-Delgadillo *et al.*, (2021). Cada línea celular se creció en cajas de cultivo a 37°C y 5% de CO₂ hasta que se propagaron las células en la base de la caja y la llenaran aproximadamente en un 70-80%. Posteriormente, las células fueron tratadas con 1mL de tripsina al 0.5% se incubaron por 5 minutos en las condiciones previamente descritas. Luego se lavaron las células con medio DMEM para eliminar la tripsina. Posteriormente, se colocó nuevamente 3mL de medio DMEM y se realizó una

disgregación mecánica. Con esa suspensión, las células se colocaron en un tubo Eppendorf, se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos a 25°C, después se eliminó el sobrenadante y las células sedimentadas en el fondo se suspendieron con medio (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se realizó un conteo con cámara de Neubauer, utilizando un invertoscopio.

4.2.2.1 Screening de derivados semisintéticos de *AmDG*.

Cuando se obtuvo el conteo de la suspensión celular se realizó los cálculos para preparar una suspensión celular de 5000 células/mL. 100 µL de esta suspensión celular se colocó en cada uno de los pozos de una microplaca de 96 pocillos. La placa previamente preparada se incubó por 24 horas a 37°C, bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se adicionaron a las células, 100 microlitros de *AmDG* y sus 16 derivados semisintéticos a 25µM, así como el control positivo doxorrubicina (25 µM). Se utilizó un control negativo el cual constaba de células cancerígenas sin ningún tratamiento, y se incubaron las microplacas por 24 horas bajo en las condiciones antes mencionadas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 10µL del reactivo MTT a cada uno de los pozos y se incubó la microplaca por 2 horas en obscuridad en las mismas condiciones. Posteriormente, se retiró el medio de cada pozo con una micropipeta multicanal y se agregó DMSO (100 µL/pocillo) con la finalidad de disolver el producto reducido de MTT (formazan). Por último, se realizó la lectura de la densidad óptica a 570nm utilizando un lector de placas ELISA. Se utilizó la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de viabilidad celular:

$$\% Viabilidad = \frac{D.O. \text{ de células tratadas}}{D.O. \text{ de células control}} \times 100$$

4.2.2.2 Evaluación dosis respuesta (CI₅₀) de los compuestos con mayor actividad.

Una vez realizado el screening de los derivados semisintéticos, se seleccionaron los compuestos con mejor actividad en su correspondiente línea celular (< 50µM) y se realizó un ensayo dosis respuesta usando la misma técnica de citotoxicidad usando MTT. Para esto se evaluaron 5 concentraciones diferentes (6.125, 12.5, 25, 50 y 100µM) para determinar el IC₅₀ de los compuestos más activos usando el programa de GraphPadPrism.

4.2.3 Ensayo de integridad de membrana celular y citotoxicidad (LIVE/DEATH)

En este ensayo se evaluó la citotoxicidad y la actividad sobre la membrana celular del compuesto AV18 contra la línea celular de cáncer de mama (MFC-7) mediante el ensayo LIVE/DEATH, debido a que fue el compuesto más activo y con un mejor valor de Índice de Selectividad. Con la finalidad de comprobar su efecto citotóxico e indagar el mecanismo de acción de este. Este es un ensayo de fluorescencia de viabilidad bicolor rápido. La integridad de la membrana plasmática está determinada por el homodímero de etidio-1 que ingresa a las células con membranas plasmáticas comprometidas o lisadas para unirse al ADN y emitir una fluorescencia roja. La calceína-AM se hidroliza por las endógeno-esterasas, fluórese de color verde y sirve para visualizar y analizar la integridad celular, ya que es permeable y se retiene en el citoplasma de las células no dañadas. Esta metodología se realizó de acuerdo con lo descrito por Babu *et al.*, (2017). Se colocó en una placa de seis pocillos una suspensión celular de 5000 células/mL de la línea MFC-7 en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM). Las células se incubaron a 37°C al 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente, fueron tratadas con las siguientes concentraciones de AV18: 100, 50 y 25µM. Doxorrubicina se evaluó a 25µM y un control negativo, el cual constaba de células cancerígenas sin ningún tratamiento. Se incubaron

en las condiciones antes mencionadas durante 24h. Luego se lavaron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), se tiñeron con calceína-AM (5 μ M), homodímero-1 de etidio (5 μ M) y se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 30 min. Al final se visualizaron en un microscopio de fluorescencia a dos longitudes de onda 495 (Excitación) y 515 nm (Emisión).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Análisis comparativo de resultados obtenidos en las diferentes líneas celulares de cáncer

En la Tabla 2, se observan las diferentes líneas celulares utilizadas para el cribado en una concentración de 25 μ M. Los resultados indican que el derivado semi-sintético de tipo éster AV18 tuvo un porcentaje de viabilidad celular del 41.60%, mientras que el *Am*DG y la doxorubicina tuvieron un porcentaje de viabilidad celular de 19.93 y 17.34%, respectivamente frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7. El éster AV18 fue menos activo que el producto natural y la doxorubicina sin embargo se seleccionó este compuesto para la realización de la curva dosis respuesta en la línea celular cáncer de mama MCF-7. Por otro lado, KRM-12D tuvo buena actividad frente a la línea celular de cáncer de pulmón A549 con un porcentaje de viabilidad celular de 44.15%, por lo que también se seleccionó para la realización de la curva dosis respuesta. Cabe mencionar que el producto natural *Am*DG y doxorubicina tuvieron menor actividad contra esta línea celular que el compuesto antes mencionado con porcentajes de viabilidad de 91.38 y 66.99 %, respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad (%) obtenidos del cribado a 25µm de compuestos en las diferentes líneas celulares cancerígenas

Compuesto	MCF-7		A549		HepG2		HeLa		DU145	
	%	±SD	%	±SD	%	±SD	%	±SD	%	±SD
Control Neg.	100.00	2.47	100.00	7.85	100.00	0.14	100.00	5.09	100.00	0.78
KRM-1D	100.00	10.82	54.16	3.32	75.05	6.08	88.87	2.27	73.21	0.42
KRM-5M	100.00	2.69	62.38	3.75	77.02	3.75	89.06	3.11	85.25	1.56
KRM-5D	100.00	2.12	59.38	0.35	78.74	3.61	93.68	5.64	87.08	2.97
KRM-6M	99.10	0.71	63.14	4.15	82.47	3.39	89.62	3.82	84.30	0.40
KRM-12D	71.15	3.32	44.15	0.78	81.88	1.91	72.57	6.72	86.88	2.36
KRM-13M	83.13	2.55	100.00	2.22	78.10	1.13	88.12	2.16	91.05	1.63
KCV-5D	100.00	1.98	99.66	0.71	84.25	3.40	88.74	3.55	90.84	4.88
KCV-6D	116.63	6.65	112.85	6.23	79.08	4.13	100.00	3.60	97.86	0.00
KCV-8D	100.00	6.51	100.00	2.08	85.65	1.91	93.76	3.09	79.89	0.15
KCV-9D	96.70	2.55	86.60	1.19	70.45	4.03	95.19	3.49	99.19	2.19
KCV-11D	100.00	1.56	94.42	2.89	92.73	2.26	105.7	1.19	103.87	3.18
AV16	76.38	0.14	77.22	1.27	75.71	4.81	89.54	4.67	92.17	3.54
AV17	79.07	0.78	81.88	0.99	74.81	2.83	95.35	3.54	108.95	0.49
AV18	41.60	0.92	81.20	2.19	79.61	1.84	91.58	5.50	82.40	2.55
AV19	69.80	0.64	97.69	0.49	88.31	2.55	81.96	3.97	76.30	1.70
AV20	79.00	2.99	90.61	3.72	71.56	1.41	77.98	3.13	86.06	5.37
AmDG	19.93	12.23	91.38	2.84	72.21	1.70	100	2.64	94.61	0.57
Doxorrubicina	17.34	1.34	66.99	5.00	100.00	0.14	84.17	6.50	72.84	4.10

Nota: Todos los compuestos fueron evaluados a 25µM. MCF-7 (Cáncer de mama), A549 (Cáncer de pulmón), HepG2 (Cáncer hepático), HeLa (Cáncer cervicouterino), DU145 (Cáncer de próstata)

En los resultados presentados en la Tabla 2 se evaluó la viabilidad celular de varios compuestos derivados del *AmDG* en diferentes líneas celulares de cáncer: MCF-7 (cáncer de mama), A549 (cáncer de pulmón), HepG2 (cáncer de hígado), HeLa (cáncer cérvico uterino) y DU145 (cáncer de próstata). A continuación, se discute la relación entre la estructura química de estos compuestos y su actividad biológica, utilizando como controles el *AmDG* y la doxorubicina.

Como se puede apreciar el control negativo mostró una viabilidad del 100% en todas las líneas celulares, indicando la ausencia de citotoxicidad y sirviendo como referencia para los efectos de los compuestos probados. Esto asegura que las observaciones de citotoxicidad de los compuestos evaluados no son debido a factores experimentales no controlados.

Como se observa en la Tabla 2 la citotoxicidad que presentaron todos los derivados en contra de la línea celular HeLa a 25 μ M fue baja. Cabe mencionar que todos los resultados fueron mayores al 50% de viabilidad celular, por lo que la adición de los sustituyentes al *AmDG* no fue significativa para potenciar su actividad anticancerígena contra la línea celular antes mencionada. Es importante mencionar que los derivados KRM-12D y AV20 (Figura 8) fueron los únicos que tuvieron ligera actividad 72.25 y 77.98%, respectivamente, inclusive mayor a la de los controles utilizados.

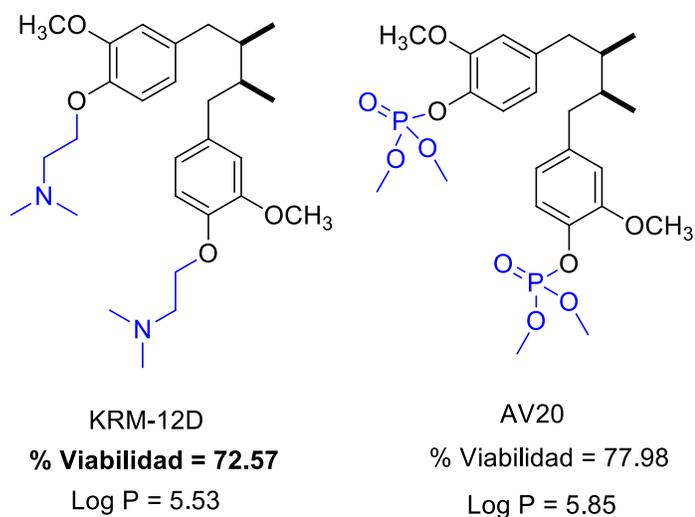


Figura 8. Estructura química de los derivados del *AmDG* más activos para la línea de cáncer cervicouterino HeLa.

El compuesto KRM-12D es un derivado disustituido de tipo aminoéter y AV20 es un derivado disustituido de tipo fosfato, ambos derivados presentan un Log P aceptable para que penetren la membrana celular y llegaran a ejercer algún mecanismo. Sin embargo, al ser baja su actividad ninguno de los compuestos fue candidato para más estudios en esta línea celular la cual resultó ser poco sensible a los compuestos ensayados.

La siguiente línea celular analizada de la Tabla 2 es la de cáncer de próstata DU145 observándose que ninguno de los compuestos tuvo mejor actividad anticancerígena que el control positivo (doxorrubicina). Se puede apreciar que el producto natural *AmDG* (94.61%) presentó baja actividad. Por otro lado, hubo dos compuestos con ligera actividad a 25 μ M, los derivados éster KRM-1D y fosfato AV19 con 73.20 y 76.29%, respectivamente (Figura 9). También podemos agregar que el éster que presenta una porción alifática (KRM-1D) tuvo ligeramente más actividad que fosfato AV19. Si comparamos ambos Log P, se puede deducir que, aunque el compuesto presente una alta

lipofilidad esta no es determinante para dar un mejor efecto sobre las células sometidas al tratamiento ante esta línea celular de cáncer de próstata DU145 la cual no es hormono-dependiente. Se sabe que esto es un factor determinante para este tipo de derivados ya que el *AmDG* (Compuesto fenólico y lignano) ha mostrado tener efectos anti estrogénicos y anti androgénicos, mimetizando este tipo de moléculas debido a su estructura fenólica en los receptores celulares.

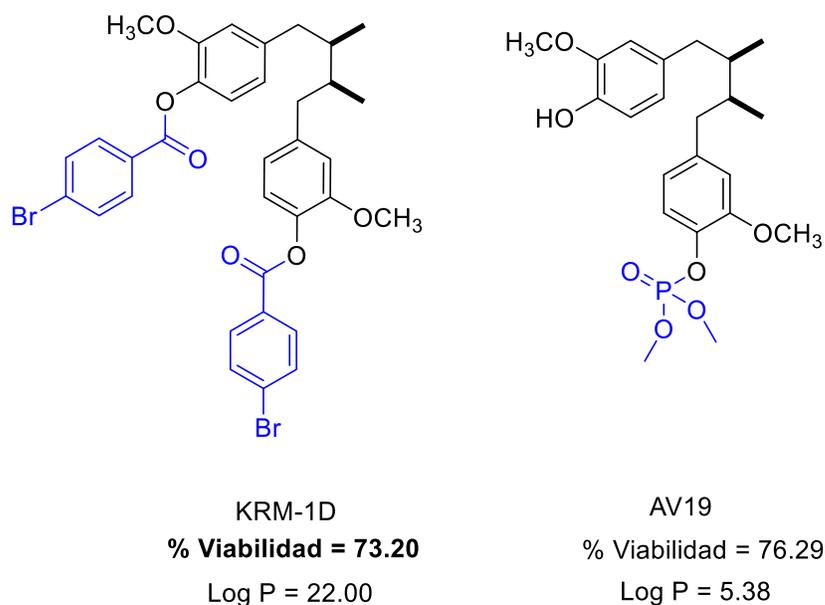


Figura 9. Estructura química de los derivados del *AmDG* más activos para la línea de cáncer de próstata DU145.

En resumen, ninguna de estas moléculas logró alcanzar la actividad esperada frente a esta línea celular DU145 por lo cual ningún compuesto fue seleccionado como parte de estudio para este tipo de cáncer.

Continuando con el análisis de la Tabla 2 tenemos la línea celular de hígado HepG2, aunque ninguno de los compuestos tuvo una actividad mayor al 50% se puede destacar un

compuesto KCV-9D el cual es un éter dando un porcentaje de viabilidad de 70.45%. Este derivado de tipo éster es ligeramente más activo que ambos controles. Si analizamos la estructura del *AmDG* y de KCV-9D el enlace éter que se usó para formar el derivado, ayudaría a penetrar mejor la membrana celular por la alta lipofilidad que alcanza el compuesto como se observa en la Figura 10 (Log P = 10.84). Mientras que el derivado disustituido de fosfato AV20 tuvo un porcentaje de viabilidad celular de 71.56% y fue más activo que su correspondiente derivado monosustituido (AV 19; Figura 9) con un porcentaje de viabilidad celular de 88.31 %, por lo que se podría decir que los compuestos fosfatos disustituidos son más potentes en esta línea celular.

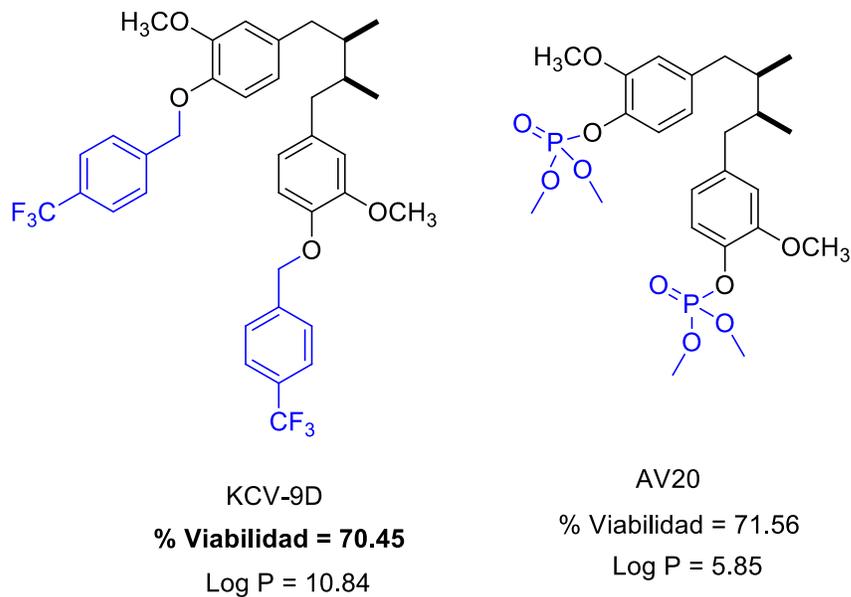


Figura 10. Estructura química de los derivados del *AmDG* ligeramente activos para la línea de cáncer hepático HepG2.

Siguiendo el análisis de la Tabla 2 se puede observar en el apartado de la línea celular A549 (Cáncer de pulmón) que uno de los compuestos evaluados KRM-12D tuvo un porcentaje de viabilidad celular de 44.15 % comparando este valor obtenido con el de los controles utilizados *AmDG* (91.18%) y doxorubicina (66.99%), superándolos en actividad. Si analizamos la estructura del compuesto base (*AmDG*) viendo como los enlaces tipo aminoéter potencializaron la actividad del *AmDG*, siendo un punto clave para el diseño de más derivados similares a este. Es importante destacar que dentro del grupo de compuestos evaluados (Figura 11) se encuentra otro aminoéter KRM-13M (100 % viabilidad celular) que tuvo actividad nula frente a la línea celular, a diferencia de KRM-12D. El aminoéter KRM-13M es una molécula monosustituida por un heterociclo de formalina, (Kumari & Singh, 2020) se sabe que las aminas tienden a aumentar o disminuir su actividad dependiendo si el nitrógeno está dentro o fuera de un ciclo. El aminoéter KRM-12D el nitrógeno se encuentra de manera acíclica lo que refleja mejor actividad (44.15 % viabilidad celular) sobre la línea celular A549. Por otro lado, cabe mencionar que ambas moléculas tienen Log P similares pero diferente actividad contra la línea celular A549.

Los derivados de tipo éster con cadenas alifáticas largas como el KRM-1D (54.16 %), KRM-5M (62.38 %), KRM-5D (59.38 %) y KRM-6M (63.14 %) se puede observar que fueron ligeramente más activos que la doxorubicina (66.99 %) en contra de la línea celular A549, pero más activos que el *AmDG* (91.38 %). Por último, se seleccionó el compuesto KRM-12D para realizar estudios de curva dosis-respuesta.

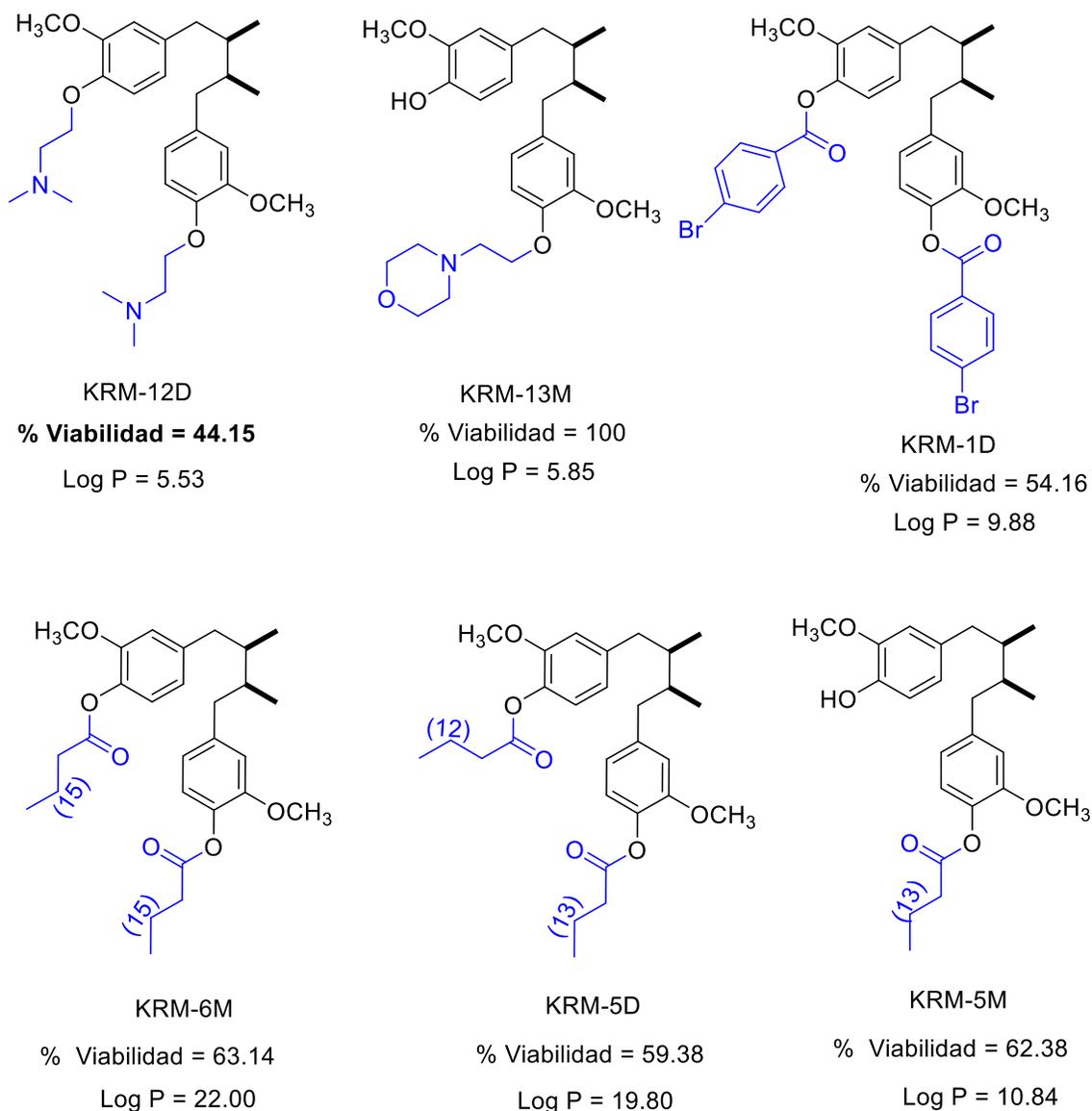


Figura 11. Estructura química de los derivados del *AmDG* más activos para la línea de cáncer de pulmón A549

Por último, se evaluó la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se analizó los resultados de la Tabla 2, observándose que ningún compuesto tuvo un porcentaje de viabilidad celular menor al de los controles utilizados, el *AmDG* (19.93%) y la doxorubicina (17.34%).

En la Figura 12 se presentan las estructuras químicas de los compuestos con mayor actividad, donde podemos observar 2 compuestos del tipo fosfatos AV19 y AV20 con porcentajes de viabilidad de 69.80 y 79%, respectivamente. También se encuentran 3 ésteres dentro los cuales destaca AV16, AV17 y AV18, con porcentajes de viabilidad celular de 76.38, 79.07 y 41.60%, respectivamente. El éster AV18 se posiciono como el compuesto más activo contra las células de cáncer de mama MCF-7. Según López & Romero 2012, los sustituyentes usados para AV18 ayudan a la molécula a tener mayor estabilidad ante la degradación enzimática celular, aumentando su lipofilicidad y penetración en la célula. Hartwig y MAK-Comission, 2022 indican que este tipo de sustituyentes suelen ser citotóxicos y favorecen la generacion de especies reactivas del oxígeno por lo cual se puede ver el incremento de la actividad anticancerígena.

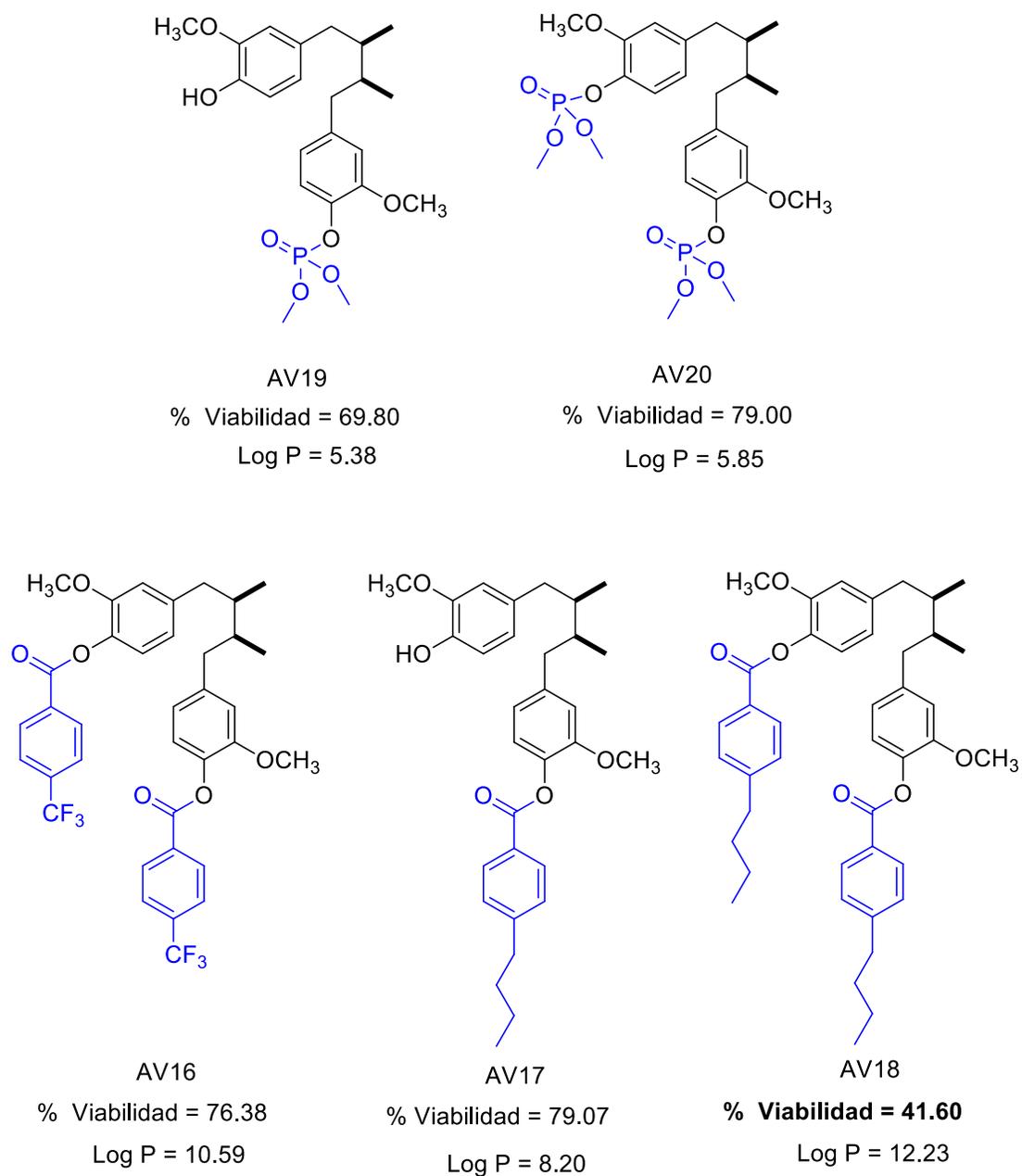


Figura 12. Estructura química de los derivados del AmDG más activos para la línea de cáncer de mama MCF-7.

En resumen, las moléculas seleccionadas para los realizar los estudios de curva dosis-respuesta son: AV18 en la línea cancerígena MCF-7 y KRM-12D en la línea cancerígena A549.

5.2. Curva Dosis-Respuesta del Compuesto AV18 vs MCF-7 y AV18 vs MCF-10

En la Figura 13, se observa los resultados obtenidos de la curva dosis respuesta, donde se muestra un aumento del porcentaje de viabilidad celular con respecto a la disminución de la concentración del derivado éster AV18 en la línea de cáncer de mama (MCF-7). Mientras que el porcentaje de viabilidad celular fue de aproximadamente 75 a 100% para la línea no cancerígena de mama (MCF-10) en las diferentes concentraciones de AV18. Por lo que se puede observar que el éster es más selectivo para las células cancerígenas MCF-7 y menos citotóxico para MCF-10.

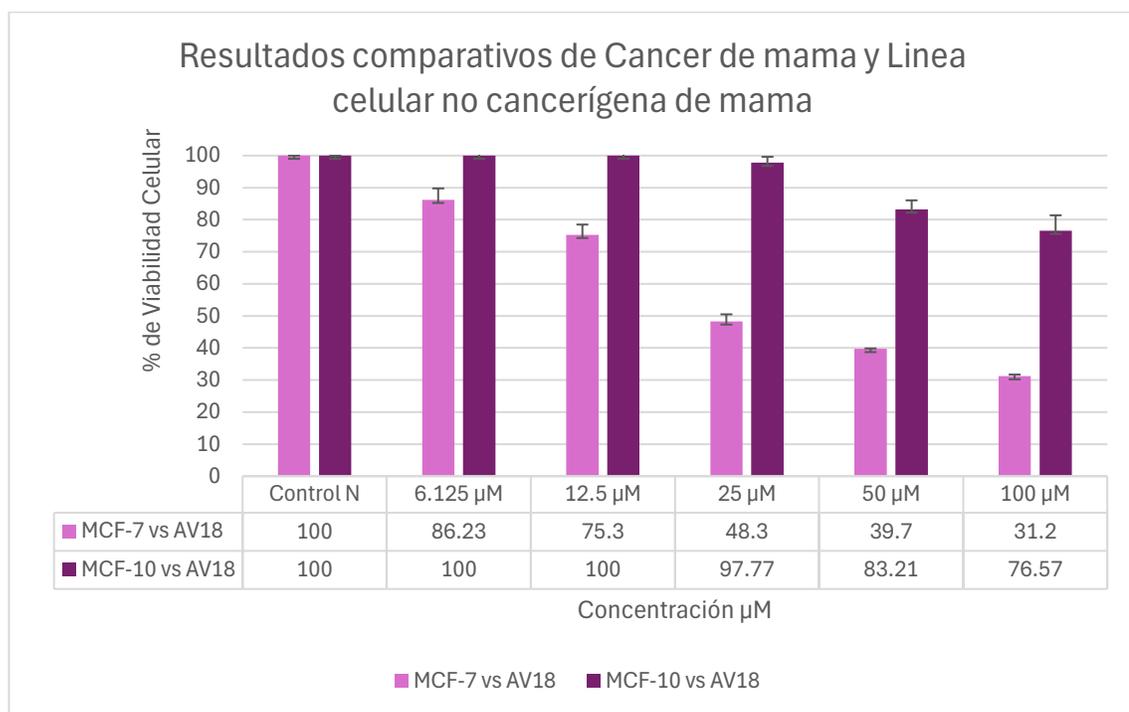


Figura 13. Porcentaje de Viabilidad celular de AV18 con las células cancerígenas (MCF-7) y no cancerígenas (MCF-10) de mama.

En la Figura 14 se observan los resultados obtenidos por el programa GraphPad Prism 8, donde se presentan las curvas dosis-respuesta en modo de gráfica sigmoidea, para el cálculo del IC_{50} donde se aplicó la siguiente ecuación:

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{(1 + X/IC_{50})}$$

Obteniéndose los IC_{50} de cada línea celular, para MCF-7 = 18.20 μ M y para MCF-10 = 41.22 μ M.

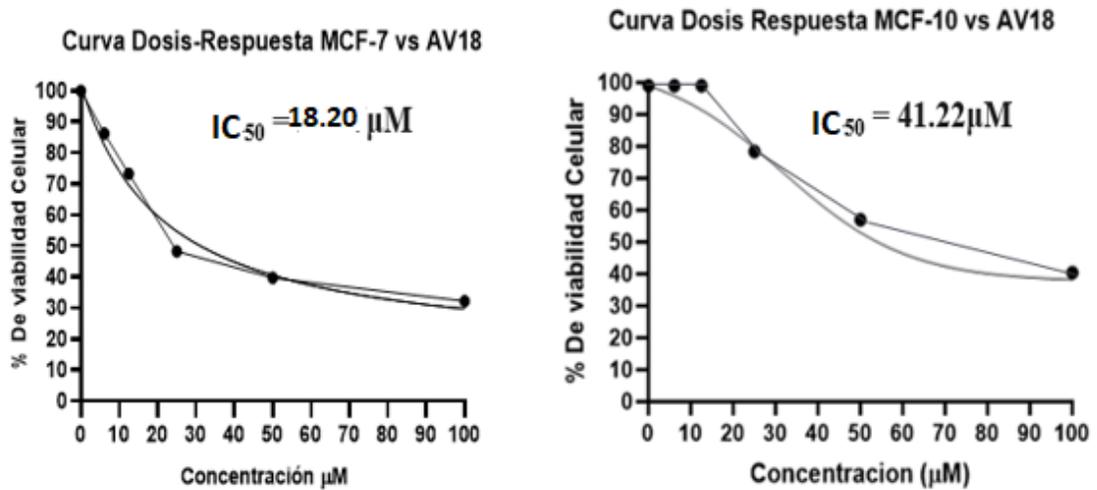


Figura 14. Curvas Dosis-Respuesta de AV18 frente a MCF-7 y MCF-10 y sus valores de IC_{50} .

El compuesto AV18 tuvo poca actividad contra las células no cancerígenas (MCF-10) obteniéndose un valor de $IC_{50} = 41.22 \mu$ M, el cual es menos activo que el IC_{50} obtenido en la línea cancerígena MCF-7 (18.20 μ M). Si se comparan los resultados obtenidos en la Figura 14 se puede destacar que el compuesto causa un daño mayor a las células cancerígenas y menor a las células no cancerígenas.

5.3. Curva Dosis-Respuesta del aminoéter KRM-12D vs A549 y KRM-12D vs LL47

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos para la línea celular no cancerígena LL47 y para la línea celular cancerígena A549. Como se puede observar los resultados son dependientes de la concentración del aminoéter KRM-12D. El comportamiento de la gráfica se puede decir que el compuesto sigue siendo más citotóxico para las células no

cancerígenas que para las no cancerígenas por lo que esto descarta la posibilidad de estudios futuros para el compuesto KRM-12D en este tipo de cáncer.

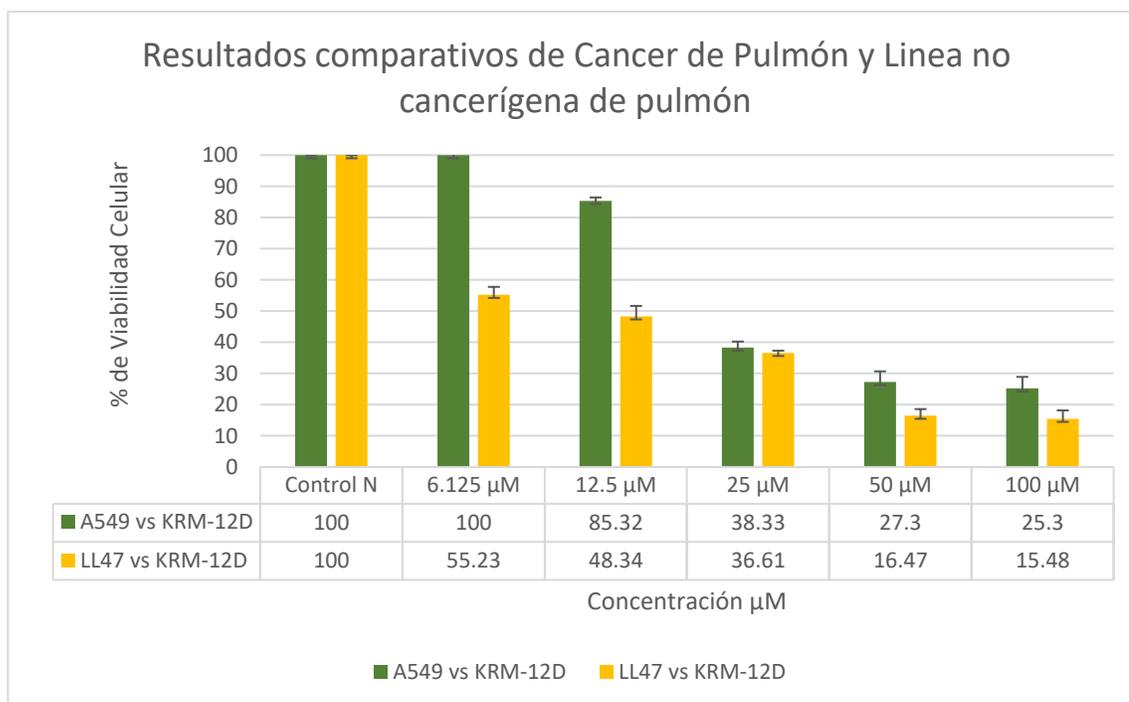


Figura 15. Resultados comparativos de Cáncer de Pulmón y Línea celular no cancerígena de Pulmón.

A continuación, se presentan las gráficas sigmoideas obtenidas para el cálculo del IC_{50} siguiendo el método aplicado anteriormente. Se observa en la Figura 16 los valores de IC_{50} calculados, obteniéndose los siguientes resultados: la línea celular cancerígena A549 tuvo IC_{50} de $17.11\mu\text{M}$, y la línea no cancerígena LL47 tuvo IC_{50} de $9.49\mu\text{M}$, confirmando, que el compuesto es más citotóxico frente a células no cancerígenas (LL47) que con las células cancerígenas (A549).

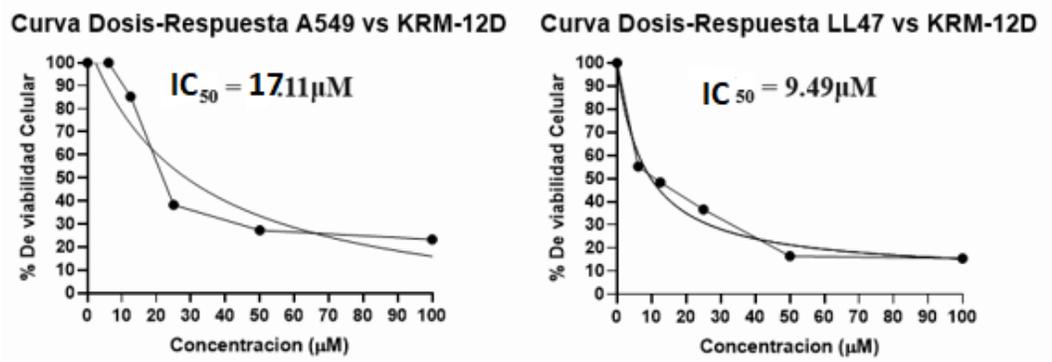


Figura 16. Curvas Dosis-Respuesta de KRM-12D frente a A549 y LL47 y sus valores de IC₅₀.

5.4. Análisis Comparativo de la eficacia del compuesto AV18 y KRM-12D (Índice de Selectividad)

En la Tabla 3 se observan los resultados en conjunto para los compuestos AV18 y KRM-12D, con sus respectivos IC₅₀ en línea celular no cancerígena y cancerígena.

Posteriormente se calculó el índice de selectividad para ambos compuestos, utilizando la siguiente ecuación:
$$\text{Índice de selectividad} = \frac{IC_{50} \text{ células no cancerígenas}}{IC_{50} \text{ células cancerígenas}}$$

El índice de selectividad del compuesto KRM-12D como era de esperarse de acuerdo con los IC₅₀ obtenidos fue menor a 1, lo que indica que el compuesto es mayormente citotóxico para las células pulmonares no cancerígenas que las cancerígenas. Por otro lado, el compuesto AV18, obtuvo un índice de selectividad de 2.26, lo cual es indicativo de que el éster AV18 es más citotóxico contra las células cancerígenas de mama y menos citotóxico contra las células no cancerígenas de mama. Por lo que AV18 fue seleccionado para estudios posteriores de mecanismo de acción, realizando la prueba de LIVE/DEATH (Figura 17).

Tabla 2. IC₅₀ e índice de selectividad (IS) de derivados de *AmDG*.

Compuesto vs línea celular	IC₅₀ (μM)	índice de selectividad (IS)
AV18 vs MCF-10. (Normal)	41.22 ± 2.17	2.26
AV18 vs MCF-7. (Cancerígena)	18.20 ± 1.98	
KRM-12D vs LL47 (Normal)	9.49 ± 1.19	0.55
KRM-12D vs A549. (Cancerígena)	17.11 ± 2.11	

5.5. Aporte al Mecanismo de Acción de AV18 mediante la Prueba LIVE/DEATH

En la Figura 17 se observan las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de la prueba de LIVE/DEATH. Los resultados indican que el control positivo doxorubicina causa daño similar que el compuesto AV18 a una concentración de 25μM. También se observan células teñidas de color verde que son metabólicamente activas. Esto es posible gracias a la presencia de esterasas que convierten la calceína-AM en calceína, que es una molécula fluorescente a 485nm. Las células que presentan fluorescencia roja indican que han experimentado cambios en la membrana debido a apoptosis o necrosis, lo que permite la penetración del homodímero de etidio-1, que es impermeable a la membrana.

En las imágenes obtenidas de las células tratadas con el derivado AV18, se observa un patrón fluorescente a concentraciones de 25, 50 y 100μM. Al analizar la morfología de estas células tratadas, se aprecia que las células se hacen redondas. Además, al combinar los filtros, se identifican células con membrana intacta teñidas de rojo, lo que sugiere que están entrando en un proceso de muerte celular. También se nota una reducción de pseudópodos en algunas células, las cuales muestran una coloración verde menos intensa

en comparación con el resto de las células que no presentan cambios visibles en su morfología. Lo anterior es consistente con el hecho de que la apoptosis mantiene la membrana intacta hasta las últimas etapas del proceso. También, se observa que algunas células teñidas de rojo tienen una morfología redondeada y de tamaño pequeño, o en forma de medialuna en algunos casos, lo que puede ser indicativo de fragmentación nuclear. Haciendo un análisis más detallado de las células tratadas con el compuesto AV18, se puede observar que si se aumenta la concentración a 50 μM y 100 μM se aumenta el daño a las células cancerígenas. Esto indica que el daño celular que causa este compuesto es dependiente de la concentración.

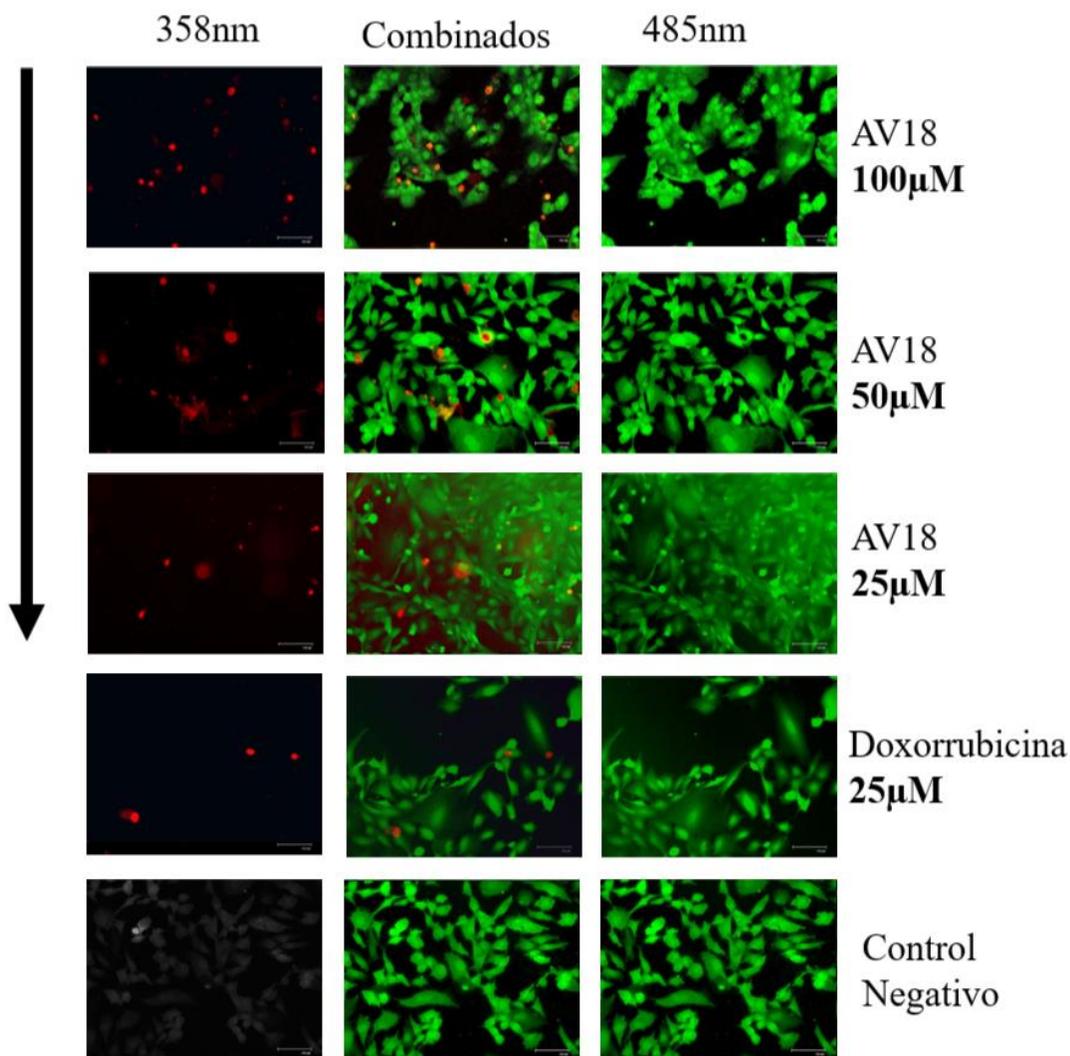


Figura 17. Ensayo de LIVE/DEATH AV18 vs MCF-7.

De manera general los derivados semisintéticos de *AmDG* demostraron tener una buena respuesta contra líneas celulares cancerígenas. Una amplia gama de estos compuestos obtuvo mejor actividad anticancerígena que su precursor natural *AmDG* a $25\mu\text{M}$. Se destaca la actividad de los compuestos AV19, AV-20 y KRM-12D contra cáncer cervicouterino (Tabla 2). Los derivados KRM-1D, KCV-8D y AV19 contra cáncer de próstata (Tabla 2). El derivado KCV-9D y AV20 contra cáncer hepático (Tabla 2). El derivado KRM-12D contra cáncer de pulmón (Figura 15). El derivado AV18 contra

cáncer de mama (Figura 13). Los cuales presentaron menores porcentajes de viabilidad celular comparados con el *AmDG*, lo que se traduce en una mejoría de la actividad citotóxica en base a las modificaciones semisintéticas realizadas sobre el *AmDG*.

Uno de los derivados semisintéticos con mayor actividad evaluados en este estudio fueron el derivado KRM-12D que demostró tener una actividad citotóxica moderada ($IC_{50} = 17.11 \mu M$) contra la línea celular cancerígena de pulmón (A549). Otro derivado el compuesto AV18 tuvo una actividad citotóxica moderada ($IC_{50} = 18.20 \mu M$) contra la línea celular cancerígena de mama (MCF-7). Lo anterior en base a los criterios de validación de ensayos de citotoxicidad de Indrayanto, et al. (2020).

El compuesto AV18 mostró mayor selectividad contra las células cancerígenas en comparación con las normales según su índice de selectividad ($IS = 2.26$) obtenido de la evaluación entre la línea celular cancerígena (MCF-7) y la normal de mama (MCF-10). En base a los criterios de Indrayanto., et al. (2020), el compuesto AV18 es candidato a una reevaluación para dar seguimiento a su selectividad con otro biosistema (*in vitro e in vivo*). Por otro lado, se destaca un comportamiento dosis dependiente de ambos compuestos debido a la disminución de la viabilidad celular en medida la concentración de ambos derivados (Figura 13 y Figura 15).

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Se logró determinar la actividad anticancerígena de los derivados semisintéticos de *AmDG*, obteniendo en la mayoría de los casos mejores resultados que su precursor natural. Lo cual indica la notoria mejoría de la actividad citotóxica de los compuestos semisintéticos que se sintetizaron en base al lignano *AmDG*. El compuesto AV18 destacó por su actividad citotóxica moderada ($IC_{50} = 41.22 \mu M$) y buena selectividad ($IS = 2.26$) contra la línea celular de cáncer de mama (MCF-7). Por lo que se propone realizar estudios complementarios para conocer más sobre su mecanismo de acción, así como estudios *in silico* e *in vivo*.

El derivado semisintético KRM-12D también destacó por su actividad anticancerígena moderada ($IC_{50} = 17.11 \mu M$) frente a la línea celular de cáncer de pulmón A549, pero fue citotóxico para células no cancerígenas de pulmón (LL42), obteniéndose en este caso un SI menor de uno (0.55).

El mecanismo de acción de AV18 sugiere que esta molécula tiene la propiedad de activar la apoptosis de igual manera como lo hace el *AmDG* de acuerdo con el ensayo de LIVE/DEATH.

Finalmente, se acepta la hipótesis planteada, ya que al menos 2 de los derivados fueron más citotóxicos que el producto natural *AmDG* y la doxorubicina, dando paso a seleccionar el compuesto AV18 para estudios posteriores *in vitro*, *in vivo* o *in silico*, para continuar estudiando su mecanismo de acción, y es posible candidato para la obtención de nuevos fármacos quimioterapéuticos más seguros para el paciente.

CAPÍTULO VII

PERSPECTIVAS

- Evaluar el compuesto AV18 frente a una línea de cáncer de próstata hormono-dependiente como la línea celular PC3
- Realizar más estudios para indagar sobre el mecanismo de acción, como el estudio de las Caspasas 3 y Anexina V, así como adicionar un estudio para el daño a la membrana (Detección de LDH)
- Evaluar el comportamiento de la actividad anticancerígena de las moléculas monosustituidas con respecto a las disustituidas de KRM-12D y AV18
- Reevaluar el IC₅₀ de KRM-12D y AV18 a las 48 horas de tratamiento
- Realizar pruebas de Genotoxicidad como el ensayo Cometa para AV18
- Sintetizar nuevas moléculas, pero con un patrón similar de sustituyentes, para ver si se potencia más el efecto antitumoral.
- Realizar pruebas en animales de experimentación para verificar la eficacia y seguridad del derivado AV18

CAPITULO VIII

REFERENCIAS

- AlMotwaa, S. M. (2021). Coupling Ifosfamide to nanoemulsion-based clove oil enhances its toxicity on malignant breast cancer and cervical cancer cells. *Pharmacia*, 68(4), 779-787. doi:10.3897/pharmacia.68.e68291
- Babu, R., Charanya, S., Biradar, S., Goornavar, V., Jeffers, R., Ronurpraful, T., . . . Ramesh , G. (2018). Synthesis, Characterization and Biocompatibility Studies of Gold Nanoparticles from Zingiber officinal. *BioNanoScience*, 7(4), 558–564. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0427-x>. . doi:<https://doi.org/10.1007/s12668-017-0427-x>.
- Behranvand, N., Nasri, F., & Zolfaghari Emameh, R. (05 de August de 2021). Chemotherapy: A double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother*, 71, 507-526. doi:<https://doi.org/10.1007/s00262-021-03013-3>
- Charanya, S., Biradar , S., Goornavar, V., Jeffers, R., Ronurpraful, T., Prabhu, T., . . . Ramesh, G. (2017).
- Chávez-Villarreal, K., Garcia, A., Romo-Mancillas, A., Garza-González , E., De Torres, N., Miranda, L., . . . Del Rayo-Camacho Corona, M. (2018). Synthesis, antimycobacterial evaluation, and QSAR analysis of meso-dihydroguaiaretic acid derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 27(4), 1026–1042. doi:<https://doi.org/10.1007/s00044-017-2125-1>

- Choi, M., Jeong, H., Kang, T., Shin, H., Oh, S., Choi, Y., & Jeon, S. (2015). Meso-dihydroguaiaretic acid induces apoptosis and inhibits cell migration via p38 activation and EGFR/Src/intergrin $\beta 3$ downregulation in breast cancer cells. *Life Sciences*, *141*, 81-89. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.09.003>
- Firdayani, F., Shelvi, L., & Witanto, B. (noviembre de 2023). Synthesis and Cytotoxic Evaluation of 3-Dimethyl Carbamoyl Emodin. *9*(2). doi:(<https://doi.org/10.15408/jkv.v9i2.34654>)
- Hartwig, A., & MAK-Comission. (2022). n-Butylbenzene. *MAK Collection for Occupational Health and Safety*, *7*(31). doi:https://doi.org/10.34865/mb10451e7_3or
- Heinrich, M., Barnes, J., Prieto García, J., Gibbons, S., & Williamson, E. (2018). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy* (Third edition ed.). Elsevier.
- Hernández-Delgadillo, R., García-Cuéllar, C., Sánchez-Pérez, Y., Pineda-Aguilar, N., Martínez-Martínez, M., Rangel-Padilla, E., . . . Cabral-Romero, C. (2018). In vitro evaluation of the antitumor effect of bismuth lipophilic nanoparticles (BisBAL NPs) on breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 6089–6097. doi:<https://doi.org/10.2147/IJN.S179095>.
- Indrayanto, G., Putra, G., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. In Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. *Elsevier Inc*, *46*(1). doi:<https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005>

- INEGI. (2023 de febrero de 02). *Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática*. Recuperado el 01 de 04 de 2024, de <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=7969#:~:text=En%202021%2C%20en%20M%C3%A9xico%20se,2010%2C%20a%207.06%20en%202021.>
- Izquierdo, E., & Zarain, A. (2018). Mecanismos moleculares de los fitoestrógenos y su relación con el cáncer. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(4), 101-110.
- Kumari, A., & Singh, R. (2020). Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). *Bioorganic Chemistry*, 96. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103578.
- Lambert, J., Sang, S., Dougherty, A., Caldwell, C., Meyers, R., Dorr, R., & Timmermann, B. (2005). Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, 66(7), 811–815. doi:10.1016/j.phytochem.2005.02.007
- López, S., & Romero, Á. (2012). Grupo trifluorometilo: un sustituyente importante en química medicinal. *Revista De La Facultad De Farmacia*, 74(2), 40-52. Obtenido de http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/article/view/1544
- Munir, K., Elahi, H., Ayub, A., Frezza, F., & Rizzi, A. (23 de Agosto de 2019). Cancer Diagnosis Using Deep Learning: A Bibliographic Review. *Cancers*, 11(9). doi:<https://doi.org/10.3390/cancers11091235>
- Napiórkowska, M., Cieslak, M., Kazmierczak, J., Królewska-Golinska, K., & Nawrot, B. (18 de Abril de 2019). Synthesis of New Derivatives of Benzofuran as Potential Anticancer Agents. *Molecules*, 24. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules2408152>

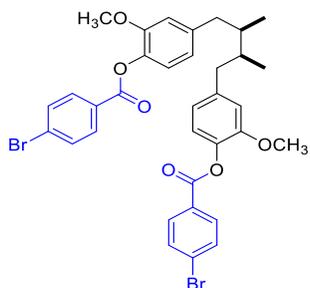
- Newman, D., & Cragg, G. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. doi:<https://doi.10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Nurgali , K., Jagoe R, T., & Abalo , R. (2018). Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Frontiers in Pharmacology*, 9. doi:10.3389/fphar.2018.00245
- Organización Mundial de la Salud. (02 de febrero de 2022). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 08 de abril de 2024, de <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/cancer>
- Reyes-Melo, K., Galvan-Rodrigo, A., Martínez-Olivo, I., Nuñez-Mojica, G., Avalos-Alanis, F., García, A., & Del Rayo-Camacho, M. (2021). Larrea tridentata and its Biological Activities. *Current topics in medicinal chemistry*, 21(26), 2352–2364. doi:10.2174/1568026621666210727170908.
- Thuong , P. T., Hung, T. M., Khoi, N., Nhung, H., Chinh, N., Quy, N., . . . Na, M. (2014). Cytotoxic and anti-tumor activities of lignans from the seeds of Vietnamese nutmeg Myristica fragrans. *Archives of pharmacal research*, 37(3), 399–403. doi:10.1007/s12272-013-0185-4
- Vázquez-Ramírez, A. (2018). Síntesis de nuevos ésteres y fosfatos del ácido meso-dihidroguaiarético; determinación de su actividad contra bacterias resistentes y Mycobacterium tuberculosis así como su interacción con la enzima DXR in silico (tesis de maestría). *Universidad Autónoma de Nuevo León*.

Yamauchi, S., Tanimura, R., Nishiwaki, H., Nishi, K., Sugahara, T., Maruyama, M., . . .

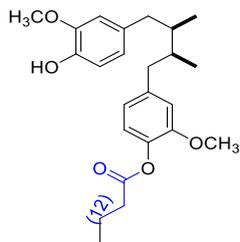
Kishida, T. (s.f.). Enantioselective syntheses of both enantiomers of 9'-dehydroxyimperanene and 7,8-dihydro-9'-dehydroxyimperanene and the comparison of biological activity between 9-norlignans and dihydroguaiaretic acids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(13), 3019-3023. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.020>

ANEXOS

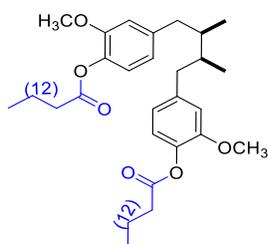
ANEXO 1. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DERIVADOS DEL *AmDG* DEL TIPO ESTER



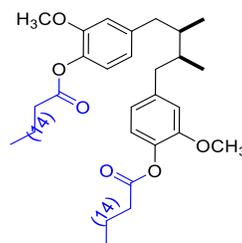
(±)-1-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-(2R,3S)-dimetil-4-[4-(4-bromobenzoiloxi)-3-metoxifenil]butano (KRM-1D)



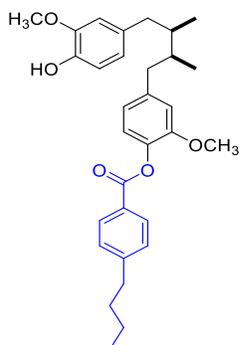
(±)-1-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-(2R,3S)-dimetil-4-(3-metoxi-4-palmitoiloxifenilo) (KRM-5M)



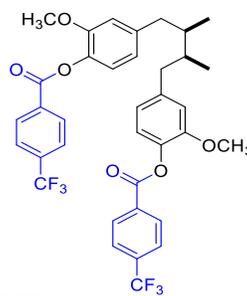
meso-1,4-bis(3-metoxi-4-palmitoiloxifenil)-(2R,3S)-dimetilbutano (KRM-5D)



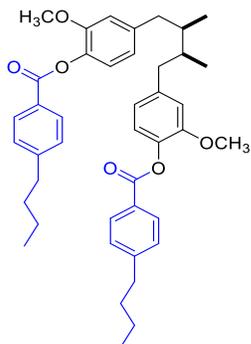
meso-1,4-bis(3-metoxi-4-estearoiloxifenil)-(2R,3S)-dimetilbutano (KRM-6D)



4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil-4-butilbenzoato (AV17)



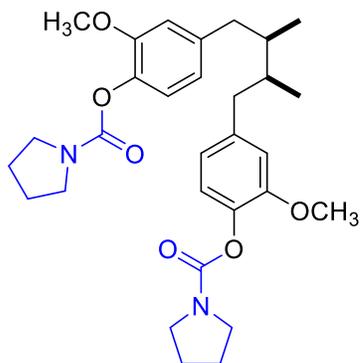
((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenilene) bis(4-(trifluorometil)benzoato). (AV16)



((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diyl) bis(2-metoxi-4,1-fenilene) bis(4-butilbenzoato) (AV18)

ANEXO 2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DERIVADOS DEL *Am*DG DEL

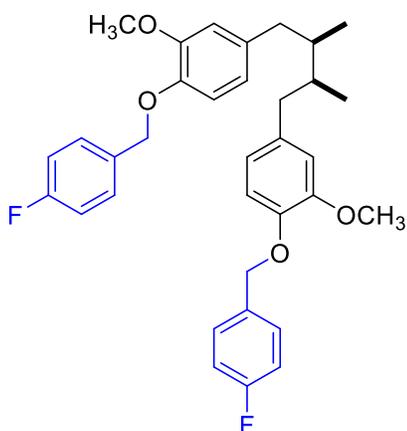
TIPO CARBAMATO



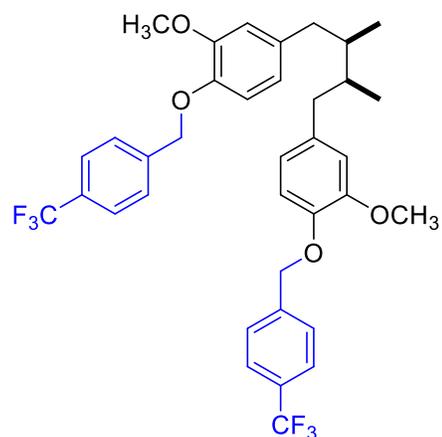
4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis(2-metoxi-4,1-fenileno) bis(pirrolidina-1-carboxilato) (KCV-5D)

ANEXO 3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DERIVADOS DEL *AmDG* DEL

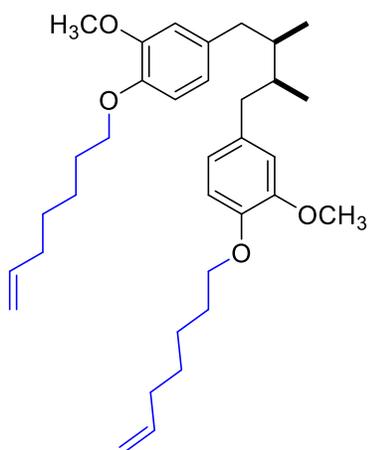
TIPO ÉTER



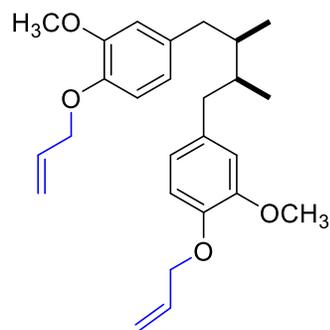
4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(4-fluorobenciloxi)-2-metoxibenceno] (KCV-11D)



4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[2-metoxi-1-(4-(trifluorometil)enciloxi)benceno] (KCV-9D)



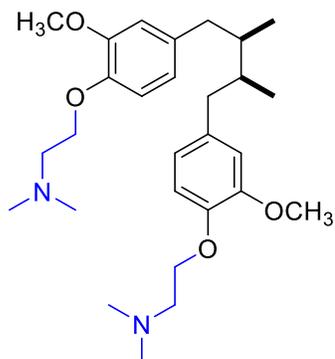
4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(but-3-eniloxi)-2-metoxibenceno] (KCV-6D)



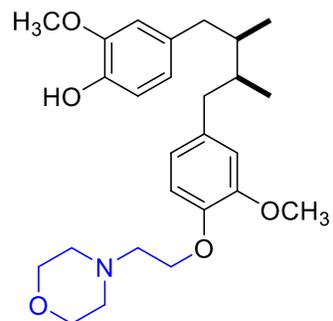
4,4'-[(2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil]bis[1-(hept-6-eniloxi)-2-metoxibenceno] (KCV-8D)

ANEXO 4. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DERIVADOS DEL *Am*DG DEL

TIPO AMINOÉTER



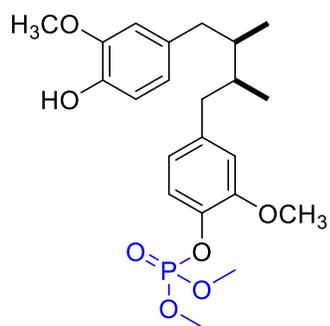
2,2'-(((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diilo)bis(2-metoxi-4,1-fenileno))bis(oxi))bis(N,N-dimetiletan-1-amina)



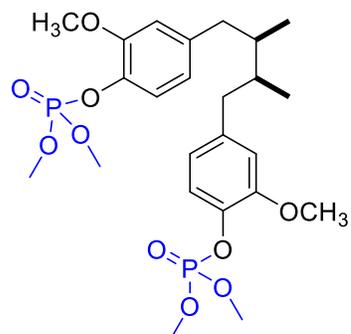
(±)-1-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-(2R,3S)-dimetil-4-(4-acetoxi-3-metoxifenil)butano (KRM-13M)

ANEXO 5. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DERIVADOS DEL *AmDG* DEL

TIPO FOSFATO



4-((2S,3R)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil dimetil fosfato (AV19)



4-((2R,3S)-4-(4-((dimetoxifosforil)oxi)-3-metoxifenil)-2,3-dimetilbutil)-2-metoxifenil dimetil fosfato (AV20)

ANEXO 6. CONSTANCIA DEL CONGRESO



 **UADY**
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

Sociedad Química de México, A. C.
otorga la presente

 **SOCIEDAD QUÍMICA
DE MÉXICO, A.C.**
"La química nos une"

CONSTANCIA

a

José Antonio Domínguez Chavarría, Karen Y. Reyes-Melo, Karen Chávez-Villareal, Ana L. Vásquez-Ramírez, Abraham García, Claudio Cabral-Romero, Francisco G. Ávalos-Alanís, **María del Rayo Camacho-Corona**

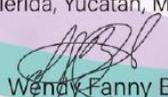
por su participación presentando el Trabajo en Modalidad Presentación Oral titulado

Actividad anticancerígena in vitro de análogos del ácido meso-dihidroguaiaarético. CISQM-PN-PO01

en el Marco de las Actividades del
Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2022,
"Una Química: Muchas Voces"

29 de agosto al 2 de septiembre de 2022
Mérida, Yucatán, México.


Dr. David Quintanar Guerrero
Presidente Nacional Electo
Presidente de Congresos
Sociedad Química de México, A.C.


M. en C. Wendy Fanny Brito Loeza
Presidente del Comité Organizador Local CISQM 2022
Pro-secretaria, Comité Ejecutivo Nacional
Sociedad Química de México, A.C.


Dr. Alfonso Ramón García Márquez
Cordinador del CISQM2022
Tesorero, Comité Ejecutivo Nacional
Sociedad Química de México, A.C.

Cytotoxicity Activity of Some *meso*-Dihydroguaiaretic Acid Derivatives and Mode of Action of the Most Active Compound.

José Antonio Domínguez-Chavarría,^[a] Abraham García,^[a] Antonio Romo-Mancillas,^[b] Karen Y. Reyes-Melo,^[a] Karen G. Chávez-Villareal,^[a] Ana L. Vázquez-Ramírez,^[a] Francisco G. Ávalos-Alanís,^[a] Claudio Cabral-Romero,^[c] Rene Hernández-Delgadillo,^[c] Claudia María García-Cuellar,^[d] and María del Rayo Camacho-Corona*^[a]

The aim of this study was to screen sixteen *meso*-1 semi-synthetic derivatives bearing ether, ester, carbamate, phosphate or aminoether functional groups against five cancer cell lines: MCF-7 (breast), A549 (lung), HepG2 (liver), HeLa (cervix), and DU145 (prostate) at 25 μ M using the MTT assay. Results from the screening showed that two derivatives had the lowest percentage of cell viability at 25 μ M, the aminoether derivative *meso*-11 and the ester derivative *meso*-20 against A549 (44.15 \pm 0.78 %) and MCF-7 (41.60 \pm 0.92 %), respectively. Then, it was determined the IC₅₀ value of each compound against their most sensitive cancer cell line. Results showed that

aminoether derivative *meso*-11 showed potent cytotoxicity against A549 (IC₅₀ = 17.11 \pm 2.11 μ M), whereas it resulted more cytotoxic against the LL-47 lung normal cell line (IC₅₀ = 9.49 \pm 1.19 μ M) having a Selective Index (SI) of 0.55. On the other hand, the ester derivative *meso*-20 exhibited potent activity against MCF-7 (IC₅₀ = 18.20 \pm 1.98 μ M), whereas it displayed moderate cytotoxicity against the MCF-10 breast normal cell line (IC₅₀ = 41.22 \pm 2.17 μ M) with a SI of 2.2. Finally, studies on the mechanism of action of *meso*-20 indicated disruption of MCF-7 plasma membrane *in vitro* and the AMPK activation *in silico*.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), cancer incidence and mortality statistics accounted for *circa* 19.3 million cases and 9.9 million deaths in 2020, with lung, colorectum, liver, stomach, breast, and prostate cancers being the most common and lethal ones.^[1] Different strategies have been implemented to prevent or treat cancer with relative efficacy, side effects, and therapeutic resistance.^[2,3] Therefore, efforts

have been focused on the discovery and development of new anticancer drugs with novel scaffolds and mechanisms of action.^[4,5]

Promising anticancer lignans have been reported to display potent activity *in vitro* and *in vivo* against breast, lung, colon, prostate, and leukemia cancer cells lines.^[6,7] Particularly, the *meso*-dihydroguaiaretic acid (*meso*-1) and some analogues (2–4, Figure 1) showed potent cytotoxicity against human breast (MCF-7, TAMR/MCF-7, ADR/MCF-7), colon (HT-29, Colo205), stomach (AGS, NCI-N87), leukemia (K562), and/or lung (A549) cancer cell lines.^[8–15] It is worth mentioning that pure stereoisomers (–)-dihydroguaiaretic acid (5) and (+)-dihydroguaiaretic acid (6) exhibited similar potency to *meso*-1 against human leukemia (HL-60), cervix (HeLa), and A549 cancer cell lines, suggesting that stereochemistry around the dimethylbutane fragment plays no determinant role in cytotoxicity.^[13,16,17] However, substitution patterns around the catechol fragments seem to have an influence on cytotoxicity.^[14,15] Recently, we reported the antibacterial and cytotoxic profiles of *meso*-1 semi-synthetic derivatives including ether, ester, carbamate,

- [a] J. A. Domínguez-Chavarría, Dr. A. García, MSc K. Y. Reyes-Melo, Dr. K. G. Chávez-Villareal, MSc A. L. Vázquez-Ramírez, Dr. F. G. Ávalos-Alanís, Prof. Dr. M. del Rayo Camacho-Corona
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, CP 66455, Nuevo León, México
E-mail: maria.camachocn@uanl.edu.mx
Homepage: <https://www.uanl.mx/investigadores/maria-del-rayo-camacho-corona/>
- [b] Dr. A. Romo-Mancillas
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Centro Universitario, Cerro de las Campanas S/N, CP 76010, Querétaro, Qro., México
- [c] Dr. C. Cabral-Romero, Dr. R. Hernández-Delgadillo
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Odontología, Laboratorio de Biología Molecular, Dr. Aguirre Pequeño y Silao S/N; Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, Nuevo León, México
- [d] Dr. C. M. García-Cuellar
Instituto Nacional de Cancerología, Subdirección de Investigación Básica, Av. San Fernando 22, Belisario Domínguez Secc. 16, Tlalpan C.P. 14080 Ciudad de México, CDMX, México
- Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301930>

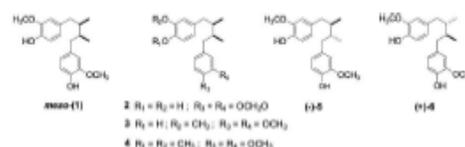


Figure 1. The *meso*-dihydroguaiaretic acid (*meso*-1) and its analogues.