

# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## (CAMPUS TUXTEPEC)

Licenciatura en Ciencias Químicas

**Simulación molecular del encapsulamiento del compuesto o-hidroxicinamaldehído con ciclodextrinas y su entrega en la vía de señalización Wnt/beta-catenina.**

### TESIS

Presenta:

**Aldo de Jesús Martínez Olguín**

Para obtener el título de:

**LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Director de tesis**

Francisco Noé Mendoza Ambrosio

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca 2021.



# Universidad del Papaloapan

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax. Tuxtepec, Oaxaca a 24 de marzo del 2021  
Asunto: Autorización de impresión de tesis

**M. E. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
**JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
**P R E S E N T E**

Sirva la presente para informarle que los abajo firmantes, miembros de la comisión revisora de la tesis presentada por ALDO DE JESÚS MARTÍNEZ OLGUÍN (Matrícula 11060131) pasante de la Licenciatura en Ciencias Químicas, manifestamos que después de examinar su trabajo de tesis autorizamos la impresión del manuscrito que lleva por título "Simulación molecular del encapsulamiento del compuesto 2- hidroxicinamaldehído con ciclodextrinas y su entrega en la vía de señalización Wnt/beta-catenina" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante. El trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Francisco Noé Mendoza Ambrosio

Sin otro asunto en particular le agradecemos la atención a la presente.

**Atentamente**  
*terra uberrima, mens aperta*  
*Beati Lo-tanna, dei ji jii*

**Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**  
**Profesora Investigadora**  
**Universidad del Papaloapan**

**Dra. Hermenegilda Moreno Diaz**  
**Profesora Investigadora**  
**Universidad del Papaloapan**

**Dr. Aurelio Ramirez Hernández**  
**Profesor Investigador**  
**Universidad del Papaloapan**

**Dr. Oscar A. Ramirez Marroquin**  
**Profesor Investigador**  
**Universidad del Papaloapan**

**Dr. F. Noé Mendoza Ambrosio**  
**Profesor Investigador**  
**Director de Tesis**

C.c.p. M. en C. Héctor López Arjona, Vice-Rector Académico de la UNPA, para su conocimiento.  
C.c.p. Dra. Rosana Martínez Pascual, Jefa de Carrera de la Licenciatura en Ciencias Químicas.

**OAXACA**



# Universidad del Papaloapan

Tuxtutepec, Oaxaca a 25 de marzo del 2021  
**ASUNTO:** Designación de sinodales

**ALDO DE JESÚS MARTÍNEZ OLGUÍN**  
**PASANTE DE LA LICENCIATURA EN CIENCIAS QUÍMICAS**  
**PRESENTE**

Por este medio le informo la propuesta de la jefatura de carrera de los Profesores-Investigadores que fungirán como revisores en su examen para obtener el Título de Licenciado en Ciencias Químicas.

Dr. Aurelio Ramírez Hernández	UNPA	Presidente
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Macnequín.	UNPA	Secretario
Dr. Francisco Noé Mendoza Ambrosio	UNPA	Vocal
Dra. Blanca E. Barrera Figueroa	UNPA	1 <sup>er</sup> Suplente
Dra. Herculánigilda Moreno Díaz	UNPA	2 <sup>a</sup> Suplente

Sin más por el momento, le envío cordiales saludos.

*Atentamente*  
*terra suberrima, mens aperta*  
*B'ou Lotama, chi ji ju*



Dra. Roxana Martínez Pascual  
Jefa de Carrera  
Licenciatura en Ciencias Químicas  
Universidad del Papaloapan

Va. Bo.  
M. en C. Héctor López Arjona  
Vicerrector Académico  
Universidad del Papaloapan

C.c.p. Dr. Francisco Noé Mendoza Ambrosio –Director de Tesis  
C.c.p. Verónica Barreras Arceval –Jefa de Servicios Especiales  
C.c.p. Archivo de la jefatura

# CONTENIDO

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABLAS .....	VIII
AGRADECIMIENTOS .....	X
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1 Objetivo general .....	2
2.2 Objetivos específicos .....	2
3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA .....	2
4. ANTECEDENTES .....	4
4.1. Historia del cáncer. ....	4
4.2. Estadísticas del cáncer .....	4
4.3. Clasificación del cáncer de colon .....	5
4.4. Síndromes hereditarios que predisponen el cáncer de colon .....	6
5. MARCO TEÓRICO .....	8
5.1. Vía Wnt.....	8
5.1.1 La vía Wnt y su relación con el cáncer. ....	9
5.1.2 $\beta$ -catenina .....	11
5.1.3 Señalización Wnt.....	14
5.1.4 Señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina.....	15
5.1.5 Vías no canónicas o independientes $\beta$ -catenina.....	17
5.1.6 Axina.....	19
5.1.7 Caseína quinasa 1a (CK1a).....	21
5.1.8 Glucógeno sintasa quinasa (GSK3).....	22
5.1.9 APC.....	23
5.1.10 Moléculas pequeñas moduladoras de la vía Wnt canónica .....	23
5.2. Inhibición del acoplamiento de la proteína $\beta$ -catenina/TCF a través del fármaco o-hidroxicinamaldehído.....	28
5.2.1 <i>Cinnamomum Cassia</i> Blume .....	30
5.2.2 Taxonomía y principio activo de la <i>Cinnamomum Cassia</i> .....	31
5.2.3 Compuesto o-hidroxicinamaldehído.....	32
5.3 Ciclodextrinas .....	34

5.3.1	Propiedades y aplicaciones de las ciclodextrinas. ....	36
5.3.2	Derivados de las ciclodextrinas. ....	39
5.3.3	Complejos de inclusión ....	39
5.3.4	El modelado molecular y las ciclodextrinas.....	40
5.3.5	Fármacos comerciales.....	41
5.4	Dinámica molecular .....	43
5.4.1	Historia de la simulación. ....	44
5.4.2	Mecánica molecular .....	45
5.4.3	El campo de fuerzas o forcé fields .....	46
5.4.5	Término de Ángulo de enlace .....	47
5.4.6	Término de Ángulo de torsión.....	48
5.4.7	Interacciones de Van der Waals .....	49
5.4.8	Interacciones electrostáticas .....	50
5.4.9	Minimización de la energía .....	50
5.4.10	Programas usados en dinámica molecular .....	52
5.5	La membrana lipídica .....	53
5.5.1	Dinámica molecular y las membranas biológicas.....	56
5.5.2	Estudios de la interacción de la beta-ciclodextrina y membranas biológicas con enfoque de dinámica molecular. ....	57
6.	CONCLUSIONES .....	61
7.	REFERENCIAS.....	64

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>AE13:</b> Citoqueratina de pelo 13	<b>MD:</b> Dinámica molecular
<b>AFAP:</b> Poliposis adenomatosa familiar atenuada	<b>MM:</b> Mecánica molecular
<b>APC:</b> Poliposis coli adenomatosa	<b>NES:</b> Señal de exportación nuclear, en inglés
<b>CA:</b> Cinamaldehído	<b>NFAT:</b> Factor nuclear AT
<b>CaMKII:</b> Calmodulina proteína quinasa II	<b>NLS:</b> Señal de localización nuclear
<b>CCR:</b> Cáncer colorrectal	<b>PKC:</b> Proteína quinasa C
<b>CDs:</b> Ciclodextrinas	<b>PLAU:</b> gen activador del plasminógeno de uroquinasa
<b>CGTasa:</b> Glucanotransferasa	<b>PLC:</b> fosfolipasa C
<b>CK1:</b> Caseína quinasa 1	<b>QM:</b> Mecánica cuántica
<b>Dvl:</b> Despeinado (dishevelled, en inglés)	<b>ROCK:</b> Espiral en espiral asociada a Rho que contiene proteína quinasa, en inglés
<b>EMT:</b> Transición epitelio mesenquima	<b>TCF / LEF:</b> factor de crecimiento de células T/ factor potenciador linfoide
<b>FAP:</b> Poliposis adenomatosa familiar	<b>TCF:</b> indicador del factor de células T
<b>Fz:</b> Encrespado (frizzled)	<b>TK:</b> timidina quinasa
<b>GMPc:</b> Guanosín monofosfato cíclico	<b>TLE/Groucho:</b> Potenciador de Split similar a la transducina
<b>GSK3<math>\beta</math>:</b> Glicógeno sintasa quinasa 3 $\beta$	<b>Wg:</b> sin alas
<b>HNPCC:</b> Poliposis adenomatosa familiar atenuada	<b>Wnt:</b> Sitio de integración relacionado con Wingless
<b>JNK:</b> Jun quinasa N-terminal	<b><math>\Theta</math>:</b> Ángulo formado entre dos átomos
<b>K1:</b> Queratina1	<b><math>\Theta_{eq}</math>:</b> Ángulo de equilibrio
<b>Ke:</b> Constante de enlace	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la $\beta$ -catenina	13
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los dominios de $\beta$ -catenina	14
<b>Figura 3.</b> Representación de las diferentes vías de señalización...	15
<b>Figura 4.</b> Vía Wnt/ $\beta$ -catenina en ausencia de ligando Wnt	16
<b>Figura 5.</b> Vía Wnt/ $\beta$ -catenina en presencia de ligando Wnt	17
<b>Figura 6.</b> Vía no canónica Wnt/Ca <sup>2+</sup>	19
<b>Figura 7.</b> Vía no canónica Wnt/PCP	20
<b>Figura 8.</b> Estructura Genómica de Axina	22
<b>Figura 9.</b> Planta <i>Cinnamomum Cassia</i> Blume	31
<b>Figura 10.</b> Estructura del o-hidroxicinamaldehído	33
<b>Figura 11.</b> Estructura de $\alpha$ -, $\beta$ - y $\gamma$ -CDs	35
<b>Figura 12.</b> Estructura de una $\beta$ -ciclodextrina	36
<b>Figura 13.</b> Diagrama esquemático de ciclodextrinas	38
<b>Figura 14.</b> Empaquetamiento de los complejos de inclusión de ciclodextrinas	39
<b>Figura 15.</b> Esquema de la formación de un complejo de inclusión	41
<b>Figura 16.</b> Esquema de las interacciones enlazantes y no enlazantes que se tienen en cuenta en un campo de fuerzas de MM	48
<b>Figura 17.</b> Ángulo de enlace del agua que se obtiene de las posiciones de los átomos	49
<b>Figura 18.</b> Potencial de interacciones de Van der Waals	50
<b>Figura 19.</b> Esquema de la superficie energética	52
<b>Figura 20.</b> Condiciones de límite periódico en dos dimensiones	52
<b>Figura 21.</b> Complejidad de la membrana celular	55
<b>Figura 22.</b> Las tres principales estructuras de fosfolípidos formados en solución; el liposoma (una bicapa cerrada), el micelio y la bicapa	56
<b>Figura 23.</b> Modelo representativo de la membrana celular	57

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales propiedades de las $\alpha$ -, $\beta$ - y $\gamma$ -CDs.	26
<b>Tabla 2.</b> Listado de programas y tutoriales para realizar simulaciones de dinámica molecular.	37
<b>Tabla 3.</b> Fármacos comerciales elaborados con ciclodextrinas.	43
<b>Tabla 4:</b> Listado de programas y tutoriales para realizar simulaciones de dinámica molecular.	53

A mi esposa Angélica, por su amor y  
comprensión.  
A mis padres Margarita y Cándido.  
A mi hermana Aracely.

**Porque el Padre da la sabiduría,  
y de su boca viene el  
conocimiento y la inteligencia**

**- Proverbios 2:6**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero comenzar agradeciendo desde lo más profundo de mi corazón a mi Señor Jesucristo. Todo lo que tengo lo debo a Él. Porque durante este camino no he dejado de ver su apoyo incondicional para hacer posible este paso de mi vida. A ti mi amado Salvador te entrego esta tesis como testimonio de admiración y gratitud.

A mi esposa Angélica, por todo el apoyo y comprensión en este trabajo y cada aspecto de mi vida que has cambiado con tu presencia, por creer en mí y seguirme en este camino.

A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, sin ustedes no sería la persona que soy hoy en día, gracias por todo su amor.

A mi hermana Aracely, por sus consejos y motivaciones en todo momento.

Quiero agradecer al Dr. Francisco Noé Mendoza Ambrosio por ayudarme a enfocar mis ideas y conocimientos, por darme la oportunidad de trabajar con él y por su apoyo, porque no sólo encontré un director de tesis, sino que también un buen amigo.

Agradezco al Dr. Guillermo Ramírez Galicia por su apoyo en mi desarrollo académico, por las horas de clases impartidas y por sus grandes consejos.

Al Dr. Aurelio Ramírez Hernández por ser un gran amigo, por los consejos de vida, su confianza y por siempre motivarme a mejorar como persona y científico.

A la jefa de carrera de licenciatura, la Dra. Roxana Martínez Pascual por su tiempo, su preocupación y su apoyo, gracias por la paciencia y la guía.

Agradezco a mis sinodales por sus aportaciones a este trabajo.

Gratitud y respeto a la Universidad del Papaloapan, así como a cada integrante de esta institución por la formación académica y apoyo que me han brindado durante estos años.

A mis amigos, que han estado conmigo en las victorias y derrotas, miles de gracias por todo.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el cáncer ha sido considerado como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, ya que en 2015 se le atribuyeron 8.8 millones de muertes, además de que se prevé un aumento de los casos anuales de cáncer a 14 millones en 2022 y en las próximas dos décadas (OMS, 2020).

El cáncer es médicamente considerado como la pérdida de la capacidad de la célula para controlar su crecimiento y desarrollo, es decir, pierde su proliferación normal (González-Molina, 2019).

Actualmente se han asociado una amplia gama de cánceres de pulmón, mama, piel y colorrectal con la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina, ya que una señalización aberrante es crucial para la progresión de cáncer, ya que se han identificado mutaciones en los alelos del gen APC, siendo la causa principal de cáncer de colon esporádico (MacDonald *et al.*, 2009; Cadigan *et al.*, 2009; Chien *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha reportado el desarrollo de cáncer sin mutaciones de APC, habiendo alteraciones en el papel de la  $\beta$ -catenina en la vía de señalización, ya que es una proteína que se localiza en el citoplasma y núcleo de la célula, participando como coactivador, siendo muy importante en procesos de embriogénesis, organogénesis y homeostasis (Mantilla, 2015). Este evento desencadena la expresión de genes que codifican proteínas que participan en la proliferación celular, diferenciación y mantenimiento de células madre. Por tanto, es importante la comprensión del funcionamiento de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina en cáncer de colon (Klaus y Birchmer, 2008; Barker y Cleavers, 2006).

Dentro de las estrategias dirigidas al desarrollo de terapias del cáncer de colon ha surgido la identificación de inhibidores ó fármacos de la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina.

Dentro de estos fármacos se ha comprobado que el compuesto o-hidroxicinamaldehído tiene propiedades antiproliferativas y antitumorales en células de cáncer colorrectal, además de actividades biológicas, como antiangiogénica, antiinflamatoria y antiplaquetarias. Se ha comprobado mediante pruebas *in vitro* que es un fármaco que actúa evitando la interacción de la  $\beta$ -catenina con TCF/LEF dentro del núcleo cuando su concentración es anormal (Lee, 2013).

Sin embargo, este fármaco presenta baja solubilidad y una alta toxicidad (DL50 de 763 mg/kg), por tanto, el encapsulamiento de este fármaco mediante ciclodextrinas permitiría un aumento de solubilidad y una entrega a su destino evitando alguna toxicidad (Cleavers, 2006).

La opción que se discute en este proyecto para encapsular el o-hidroxicinamaldehído es hacer una revisión del conocimiento actual de las ciclodextrinas para la formación de complejos de inclusión que puedan liberar el fármaco en su destino de manera adecuada y segura para el organismo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Realizar una revisión bibliográfica acerca de las ciclodextrinas y la encapsulación del fármaco 2-hidroxicinamaldehído como posible solución al cáncer de colon en la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Investigar los efectos del 2-hidroxicinamaldehído sobre la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.
- Revisar estudios de CDs y fármacos con simulación molecular.

## **3. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA**

Criterio de aceptación: Revistas Internacionales en inglés y español. Trabajos teóricos de dinámica molecular DM, montecarlo, campos de fuerza, docking molecular, cálculos cuánticos con DFT, Borh Openhammer molecular dynmics BOMD, mesoscópicos como coarse-graind CG, DPD y estudios estadísticos. Se tomaron en cuenta estudios computacionales de la interfase ciclodextrinas, fármacos y capa lipídica. Se aceptaron trabajos experimentales enfocados en el fármaco 2-hidroxicinamaldehído y la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. La idea final de la revisión es poder encontrar los conceptos o investigaciones que puedan fundamentar la dinámica molecular de la inclusión del fármaco con beta-ciclodextrina y su interacción con la pared celular simulada. Para tal efecto

usaremos, los criterios de muestra S, fenómeno de interés PI, diseño D, evaluación E, y tipo de investigación R, SPIDER, por sus siglas en inglés.

Las fuentes de información que consultamos fueron bases de datos libres y de acceso restringido usando la cuenta del CONRICyT, como por ejemplo ScienceDirect, Emerald, IOP, Nature, Springer, Wiley, Scopus, etc. Además se consultaron las bases de datos en español, como, Dialnet, Redalyc, Scielo, etc.

Para la estrategia de búsqueda se usaron las palabras que involucren los términos de interés en la investigación (tanto en inglés como en español) combinados con términos que se relacionan, por ejemplo:

- Cáncer con: colon, causas, patogenia, historia, beta-catenina, wnt, genes, proteínas y señalización.
- 2-hidroxicinamaldehído con: cáncer, extracto, antitumoral, beta-catenina, señalización, supresión y propiedades.
- Ciclodextrinas con: fármacos, complejos de inclusión, 2-hidroxicinamaldehído, simulación molecular, dinámica molecular, modelos moleculares, estudios cuánticos.
- Dinámica molecular DM con: fundamentos, teoría, campos de fuerza, docking molecular, cálculos cuánticos, programas, fármacos, ciclodextrinas, macromoléculas, 2-hidroxicinamaldehído y beta-ciclodextrinas, inclusión de fármacos, inclusión de fármacos con la pared celular, inclusión de fármacos e interfase agua/aceite, etc.
- Otra búsqueda realizada fue fármaco y otras combinaciones, como, 2-hidroxicinamaldehído y la vía de señalización Wnt/Beta-catenina, DM de la inclusión del 2-hidroxicinamaldehído y beta-CD.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1. Historia del cáncer.**

El cáncer no es una enfermedad moderna. La descripción de algunos casos de cáncer humano se registra en jeroglíficos y en papiros egipcios escritos entre el 3000 y 1500 a.C. Se han encontrado restos momificados de los incas del Perú de hace 2400 años, los cuales contenían evidencia de melanoma maligno. Por tanto, es posible que nuestros antepasados hayan desarrollado el cáncer. En 1932, el arqueólogo Louis Leakey encontró la estructura ósea con tumor de una mandíbula de Homo erectus, que al someterse al estudio se determinó que su origen se debía a un linfoma Burkitt (Hajdu, 2011; Olszewski,2010).

El griego Hipócrates (460-370 a.C.) llamó cáncer a esta enfermedad por primera vez. Usó los términos “carcinosis” y “carcinoma” que en griego significa cangrejo, esto debido que las proyecciones de un cáncer recordaban la forma de este animal. Posteriormente el médico romano Celso (28-50 a.C.) tradujo el término griego al latín (cáncer). Galeno (130-200 d.C.), utilizó el término “oncos” (que significa hinchazón) para describir a los tumores (Hajdu, 2011; Olszewski,2010).

En el siglo XX se amplió el conocimiento acerca del cáncer, con avances en la comprensión de la base genética, molecular y celular del cáncer. Además, se comenzó a considerar como una enfermedad de los tejidos, hasta finalmente considerarse de nivel celular (DeVita y Rosenberg 2012).

### **4.2. Estadísticas del cáncer**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, ya que casi una de cada seis muertes a nivel mundial se debe a esta enfermedad. Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

1. Pulmonar (1,69 millones de defunciones)
2. Hepático (788 000 defunciones)
3. Colorrectal (774 000 defunciones)
4. Gástrico (754 000 defunciones)
5. Mamario (571 000 defunciones)

Dentro de estos tipos de cáncer, tres de cada 10 muertes por cáncer en la población de 30 a 59 años, son consecuencia del cáncer en órganos digestivos. Para la población de 60 y más años, de 2011 a 2016, cuatro de cada 10 defunciones por cáncer en mujeres se deben a tumor en órganos digestivos, contra tres de cada 10 en varones, por la misma causa (INEGI, 2020).

### **4.3. Clasificación del cáncer de colon**

El cáncer colorrectal es el que se origina en el colon o el recto. A estos cánceres también se les puede llamar cáncer de colon o cáncer de recto (rectal) dependiendo del lugar donde se originen. El cáncer se origina cuando las células en el cuerpo comienzan a crecer en forma descontrolada.

Según su modo de transmisión, 3 tipos elementales de cáncer colorrectal son conocidos:

1. Esporádica
2. Familiar
3. Hereditaria

La proporción de cada uno dentro de la población varía (Burt, 2000). Las formas hereditarias y los síndromes hamartomatosos son los menos frecuentes. Los estilos transmisibles más comunes de CCR son la poliposis adenomatosa familiar (FAP, por sus siglas en inglés) y el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC, por sus siglas en inglés), aunque existen síndromes alternativos asociados con la predisposición. La fracción común al 10-30% de los casos corresponde a riesgo familiar y, por tanto, el resto a cáncer de colon esporádico.

El término esporádico se usa en ocasiones para diferenciar los cánceres que ocurren en personas que no portan una mutación que confiera susceptibilidad al crecimiento de los cánceres que ocurren en individuos que portan una mutación notoria relacionada con esta enfermedad. Esta distinción no es absoluta porque el problema genético parece influir en la probabilidad de aparición del cáncer incluso en presencia de una mutación seleccionada. Este término también describe el cáncer en aquellas personas que no poseen antecedentes familiares de cáncer. Se cree que la inmensa mayoría de los cánceres son esporádicos (NCI,2006).

Hasta ahora, no se han encontrado genes asociados a cánceres familiares. Sin embargo, los estudios de población muestran un riesgo de cáncer colorrectal de dos a tres veces mayor que la población tradicional una vez que los parientes de grado tienen "cáncer esporádico en el colon". Los factores hereditarios pueden confirmar la susceptibilidad de un individuo a desarrollar adenomas y cáncer de colon, mientras que los factores ambientales probablemente determinan que las personas genéticamente susceptibles pueden desarrollar pequeños adenomas, adenomas enormes y, por último, cáncer (Potter, 1999).

Los tipos hereditarios más comunes de cáncer colorrectal son la FAP y HNPCC, aunque existen diferentes síndromes relacionados con la predisposición.

#### **4.4. Síndromes hereditarios que predisponen el cáncer de colon**

La clasificación más completa que se ha fabricado a partir de los trastornos hereditarios que se inclinan al cáncer fue propuesta por Lynch y Lynch en 1998 (Lynch y Lynch, 1998).

Según estos autores, existen los siguientes síndromes individuales que se inclinan al CCR:

- Poliposis adenomatosa familiar (FAP).
- Poliposis adenomatosa familiar atenuada (AFAP).
- Mutación I1307K en judíos hebreos.
- Poliposis coli juvenil.
- "Síndrome de Peutz-Jeghers".
- Poliposis adenomatosa leve del colon y CCR de Burt.
- Cáncer de intestino grueso no polipoide hereditario (HNPCC).
- Cáncer familiar de intestino grueso.
- Colitis ulcerosa familiar y enfermedad de Crohn.

Con la excepción de los dos últimos, el resto se transmite de manera dominante en el cromosoma asociado.

La FAP se manifiesta en pacientes que heredan mutaciones de la línea germinal en la secuencia de APC establecida en 5q21. Este gen es el verdadero guardián de la proliferación celular dentro del epitelio del colon. La proteína APC forma homo-

oligómeros, se asocia con cateninas y se expresa en numerosos tipos de tejido (Fernhead et al., 2001). Los múltiples dominios de APC le permiten relacionarse con diferentes proteínas. Cada dominio tiene su función específica para la actividad de la proteína. Quince repeticiones de aminoácidos proporcionan a la proteína sitios de unión para la beta-catenina y 20 presentan el sitio de unión para dicha proteína. Este sitio se ha encontrado que es esencial para la unión de la  $\beta$ -catenina (Huelsenken y Birchmeier, 2001).

Las mutaciones más frecuentes del gen APC conducen a proteínas truncadas inactivas. El dominio básico permite que APC se una a los microtúbulos (Beroud y Soussi, 1996).

A la proteína APC se le conocen diversas funciones (Potter, 1999):

- Regulación de la señalización inducida por la beta-catenina.
- Regulación de la adhesión celular a través de la beta-catenina y la E-cadherina (glucoproteínas transmembranales responsables de las uniones célula-célula para mantener la integridad de los tejidos).
- Regulación de la migración celular por mediación de la interacción con los microtúbulos.
- Bloqueo del ciclo celular tal vez mediante inhibición directa de los componentes del ciclo celular.
- Regulación coordinada de la adhesión y motilidad celular (Fodde).

Tanto la proteína APC como la  $\beta$ -catenina se relacionan íntimamente en la vía wnt/ $\beta$ -catenina, cuya regulación de esta vía de señalización está basada en la presencia del ligando Wnt que produce la activación; cuando la vía está activa se impide la degradación de la proteína  $\beta$ -catenina por acción de un complejo de proteínas conocido como complejo de destrucción, conformado por quinasas, la proteína axina y la proteína adenomatosis poliposis Coli (APC). En ausencia del ligando Wnt la vía no está activa y, como consecuencia, la proteína  $\beta$ -catenina es fosforilada y posteriormente degradada en el proteasoma, impidiendo sus funciones con el factor de transcripción TCF/LEF (factor de crecimiento de células T/ factor potenciador linfoide, por sus siglas en inglés) y en la interacción célula-célula.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Vía Wnt

Las proteínas Wnt (Wingless-related MMTV integration site) son una familia de glicoproteínas solubles ricas en cisteína, codificadas por 19 genes en ratón y humano. Están implicadas en la regulación de numerosos aspectos del desarrollo neuronal y desempeñan un papel indispensable en la homeostasis de los tejidos, la renovación celular y la regeneración en el individuo adulto. Esta capacidad para controlar esta gran diversidad de procesos biológicos se puede explicar gracias a su potencial como moléculas activadoras de diferentes cascadas de señalización, donde Cada señal extracelular es transducida a través de múltiples rutas, o cascadas de señalización, en las que intervienen numerosas proteínas que ganan y/o pierden su actividad biológica mediante diversas modificaciones tales como fosforilación, desfosforilación y translocación intracelular. (Clevers 2006).

El gen Wnt1, originalmente llamado Int-1, fue descubierto en 1982 como un gen activado por la integración del ADN del virus del tumor mamario de ratón en tumores de mama inducidos por virus (Mlodzik, 2002; Miller 2001).

El gen de *Drosophila Wingless* (wg), que controla la polaridad del segmento durante el desarrollo larvario, fue identificado más tarde como un homólogo de Wnt1, a partir del cual se origina el término Wnt como una combinación de Int-1 y wg (Geyer y Gerling, 2021; Jung et al., 2020). Las investigaciones de las relaciones entre las mutaciones de polaridad de los segmentos se realizaron mediante experimentos de epistasis en 1994 que describen el núcleo de esta cascada de transducción de señales de desarrollo en *Drosophila* (Clevers, 2012; Noordermeer et al., 1994; Manoukian et al., 1995). El primer ensayo para estudiar la vía Wnt en vertebrados se estableció mediante la inyección de ARN Wnt1 de ratón en embriones de rana terrestre, lo que provocó una duplicación del eje corporal en *Xenopus* (Clevers, 2012; McMahon y Moon, 1989). Las observaciones combinadas de *Drosophila* y *Xenopus* revelaron una vía de señalización altamente conservada comúnmente designada como vía canónica Wnt (Clevers, 2012). En los años siguientes, se obtuvo información más detallada sobre la cascada de señalización, como la identificación de factores de transcripción del factor potenciador linfático del factor

de células T (TCF / LEF) como efectores nucleares de Wnt o la identificación de frizzled (FZD) como receptores de Wnt que trabajan juntos con el receptor de lipoproteínas, proteínas relacionadas (LRP) como correceptores (Behrens et al., 1996; Moolenaar et al., 1996; Bhanot et al., 1996).

La vía Wnt se conectó directamente con las enfermedades humanas por primera vez en los inicios de la década de los 90s. En 1991 Kinzler y col. y Nishido et al. descubrieron el gen de la poliposis adenomatosa coli (APC) de forma independiente en un síndrome de cáncer hereditario denominado poliposis adenomatosa familiar (FAP) (Kinzler et al., 1991; Nishisho et al., 1991). Poco después, se identificó que la proteína APC citoplasmática grande está interactuando con la beta-catenina (Rubinfeld et al., 1993; Su, Vogelstein y Kinzler, 1993). En las últimas dos décadas, se identificaron componentes de la vía adicional y conexiones de enfermedades que indicaron la vía Wnt como una de las señales de transducción más importantes en la patogenia de muchas enfermedades cancerígenas (Clevers, 2012).

### **5.1.1 La vía Wnt y su relación con el cáncer.**

El antecedente en la relación de la vía Wnt y el cáncer se registra en 1982 cuando se descubre el protooncogen Int-1 asociado con tumores en la glándula mamaria (Nusse y Varmus, 1982), dando lugar posteriormente a lo que hoy conocemos como los ligandos Wnt.

En pacientes con FAP y en el 85% de los casos de pacientes con cáncer colorrectal esporádico se encontraron mutaciones en APC. De hecho, estas mutaciones truncantes se encontraron en ambos tipos de pacientes, aunque una sola mutación del gen no es suficiente para el desarrollo de los pólipos y siempre es necesario un segundo evento (Nishisho et al., 1991; Kinzler y Vogelstein, 1996).

Cómo se ha mencionado anteriormente, APC es a su vez esencial para la vía WNT pues es capaz de unirse a  $\beta$ -catenina influyendo en su regulación a nivel del complejo de degradación como hemos visto anteriormente. La literatura hace mención que la estabilización de  $\beta$ -catenina es un evento temprano en la carcinogénesis (Bienz y Clevers, 2002). Se tiene constancia de que la introducción

de la región central de APC por donde ancla  $\beta$ -catenina es suficiente para reducir los niveles de esta última y con ello reducir su potencial transcripcional.

La capacidad tumorigénica de APC estaría relacionado con su capacidad de regular el complejo  $\beta$ -catenina/TCF-4. Se sabe que las líneas celulares de cáncer de colon con mutaciones en APC, contienen altos niveles de  $\beta$ -catenina y favorecen la formación del complejo  $\beta$ -catenina-TCF (Bienz y Clevers, 2002; Korinek et al., 1997).

La  $\beta$ -catenina es diana de alteraciones que favorecen la activación de la vía WNT. Deleciones y mutaciones se han descrito en el exón 3 del gen que permitirían a la  $\beta$ -catenina “escapar” del control del complejo de degradación. Se ha descrito que los tumores que albergan anomalías en el gen de APC no desarrollan mutaciones en  $\beta$ -catenina, si bien las mutaciones en APC serían poco frecuentes en cánceres colorrectales esporádicos MSI-H, siendo sustituidas por mutaciones en CTNNB1. Algunos autores afirman que aunque ciertos trabajos relacionan las mutaciones de  $\beta$ -catenina con tumores MSI-H, estudios posteriores no lo confirman, estando en todo caso asociadas a pacientes con HNPCC (Lovin et al., 20002).

Axina2 es un gen en el que se han descrito alteraciones en repeticiones mononucleotídicas de su secuencia. También se ha reportado una hipermetilación del promotor en tumores con alta inestabilidad en microsatélites que favorece el crecimiento celular, siendo un gen relevante en la tumorigénesis (Koinuma et al., 2006).

Estos son los principales componentes con mutaciones relacionadas con la vía Wnt en tumores colorrectales. En cuanto a la regulación epigenética, la literatura detalla silenciamiento de promotores por hipermetilación en SFRP (Suzuki et al., 2004) y en DKK en tumores colorrectales primarios y líneas celulares de cáncer de colon. WIF1 también muestra niveles bajos de expresión por hipermetilación del promotor en los mismos casos, evento considerado a su vez como temprano en la carcinogénesis (Taniguchi, 2006). Estos tres componentes han sido clasificados como reguladores negativos de la vía Wnt.

Por otro lado, se han descrito alteraciones por mutación y pérdida de heterocigosidad en el gen PPP2R1B, que codifica para la subunidad A reguladora

de la fosfatasa PP2A. El cofactor transcripcional TCF-4 también presenta alteraciones en secuencias repetitivas en tumores colorrectales MSI-H y líneas celulares de cáncer de colon. Wnt5a puede tener hipermetilación del promotor en tumores colorrectales primarios y líneas celulares. En algunos casos su expresión endógena en líneas celulares, ha reducido el crecimiento clonal, favoreciendo la degradación de  $\beta$ -catenina y disminuyendo la expresión de ciclina D1, diana de la vía Wnt. A su vez, FBXW7, gen que codifica para una proteína que ubiquitina c-Myc y ciclina E, presenta baja expresión en muestras de tumores colorrectales primarios en comparación con tejido normal. Este hecho además se relaciona con características clínicas de peor pronóstico (Iwatsuki et al., 2009).

### 5.1.2 $\beta$ -catenina

La proteína  $\beta$ -catenina (figura 1) presenta un rol principal en la adhesión célula-célula por interacción con la proteína cadherina (proteínas de adhesión intercelular); la  $\beta$ -catenina regula la expresión génica a través de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Fu et al., 2011).

La  $\beta$ -catenina se encuentra en dos complejos moleculares, que corresponden a estas dos funciones: el primero corresponde a  $\beta$ -catenina como parte de complejos de alto peso molecular implicados en la adhesión celular mediada por E-cadherina; en la segunda función,  $\beta$ -catenina, se encuentra en estado monomérico participando en la señalización de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Katanaev, 2010). La coordinación de estas dos vías es fundamental para el control de los procesos como la formación del eje y mesodermo en el embrión, la diferenciación de células madre y en procesos de patogénesis como la carcinogénesis (Camili y Weeraratna, 2010).



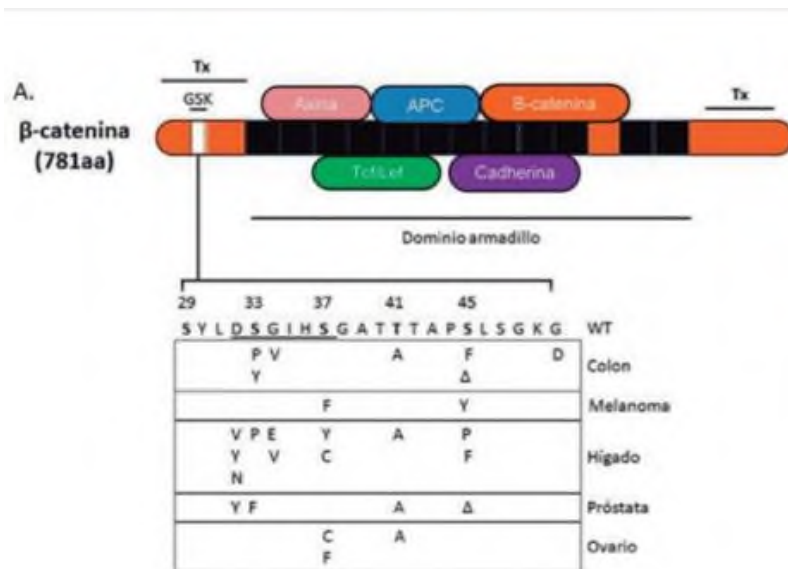
**Figura 1.** Estructura de la  $\beta$ -catenina

La  $\beta$ -catenina es una proteína de 92 kDa, codificada por el gen CTNNB1 que se localiza en el cromosoma 3p22. Esta proteína de 781 aminoácidos consta de tres dominios, amino-terminal, carboxi-terminal y central (Piedra et al., 2010).

El dominio amino-terminal (N-terminal), de aproximadamente 150 aminoácidos, es la región de unión a  $\alpha$ -catenina, clave en la interacción célula-célula. En este dominio se localizan los sitios de fosforilación de las quinasas en la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y la caseína quinasa 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) (Akiyama, 2000). El dominio carboxi-terminal (C-terminal), de 100 aminoácidos aproximadamente, permite la interacción con proteínas celulares para su papel como factor de transcripción de genes dependientes del factor de crecimiento de células T/ factor potenciador linfóide (Tcf/Lef) (Cowin, Rowlands y

Hatsell, 2005); genes como Cyclin D1, c-Myc y metaloproteinasas de matriz celular MMP-2, 3, 7, 9, 13.

El dominio central de 550 aminoácidos, está formado por una secuencia de 42 aminoácidos que se repite 12 veces, dominio conocido como “repeticiones armadillo”; esta región que presenta una estructura en hélice, tiene como función la interacción con proteínas como E-cadherina, axina, APC y Tcf/Lef (figura 2). Mediante cristalografía de rayos X se ha determinado que las 12 repeticiones armadillo forman una superhélice y un surco largo cargado positivamente; este surco interactúa con residuos ácidos consecutivos comunes en cadherinas, APC y miembros de la familia TCF (Huber, Nelson y Weis, 1997).

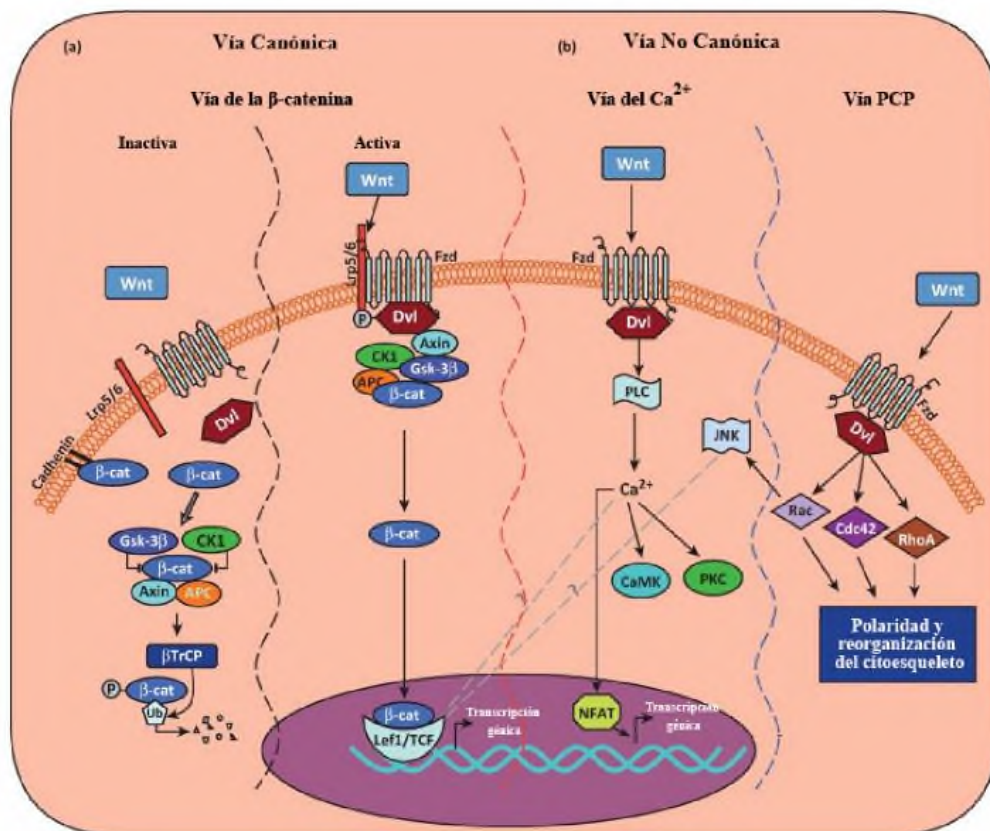


**Figura 2.** Representación esquemática de los dominios de  $\beta$ -catenina, la proteína  $\beta$ -catenina posee tres regiones: N-terminal, de unión a  $\alpha$ -catenina y sitios de fosforilación importantes en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina; C-terminal, que interactúa con proteínas de la maquinaria transcripcional; y central o dominio armadillo, dominio de interacción proteína-proteína. Mutaciones en el exón 3, ubicado en el dominio N-terminal, se han descrito en diferentes tipos de cáncer humano. APC: Adenomatosis poliposis Coli; GSK3 $\beta$ : glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ; CK1 $\alpha$ : caseína quinasa 1 $\alpha$ ; TCF/LEF: Factor de Crecimiento de Células T/Factor Potenciador Linfoide.

### 5.1.3 Señalización Wnt

La vía Wnt tiene entre sus funciones biológicas el control del desarrollo embrionario, induciendo proliferación, diferenciación, movilidad, adhesión, regeneración, entre otros. Si esta vía tiene algún tipo de alteración en su funcionamiento, puede llevar a un crecimiento celular descontrolado y a la formación de tumores. De hecho, estudios moleculares indican que alrededor de un 90% de los tumores colorrectales desarrollan mutaciones en alguno de los componentes de la vía Wnt (Wang y Wynshaw-Boris, 2004; Clevers, 2006; Huang y De, 2008).

La señalización Wnt se clasifica en vías Wnt canónicas y no canónicas (figura 3) (Dosen *et al.*, 2006; Adamson *et al.*, 1994; Missed y Varmus, 1992; Luu *et al.*, 2004). La vía de Wnt canónica a menudo también se conoce como la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, y se denominará así en esta tesis.



**Figura 3.** Representación esquemática de las diferentes vías de señalización activadas por proteínas Wnt. (a) Vía canónica o de la  $\beta$ -catenina en ausencia y presencia de ligandos Wnt. (b) Vías no canónicas de Wnt/ $Ca^{2+}$ , en la que algunos

elementos de esta vía parecen interactuar con la vía de la  $\beta$ -catenina en múltiples puntos; y vía no canónica Wnt/PCP.

#### 5.1.4 Señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina

La actividad de la vía de devaluación Wnt/ $\beta$ -catenina depende de la concentración citoplasmática de  $\beta$ -catenina. Normalmente esta proteína se mantiene en bajas concentraciones en el citoplasma gracias a un proceso de degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma.

Cuando no hay ligandos Wnt, la  $\beta$ -catenina no unida a la membrana, localizada en el citoplasma, es constantemente degradada por un complejo proteico denominado complejo de destrucción, formado por las proteínas de andamiaje APC (Adenomatosis polyposis coli), Axina y las quinasas CK1 (Caseína quinasa 1) y GSK3 $\beta$ . Estas dos quinasas fosforilan de forma secuencial a la  $\beta$ -catenina haciendo que ésta sea reconocida y ubiquitinada por la ubiquitina ligasa  $\beta$ Trcp y consecutivamente degradada por el proteosoma (figura 4). Cuando hay bajos niveles de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, los factores de transcripción TCF/LEF (factor de células T/ factor activador de linfocitos) se encuentran reprimiendo a sus genes diana por el reclutamiento de co-represores transcripcionales de la familia TLE/Groucho (del inglés “*transducin-like enhancer of split*”) (Juanes, 2020).

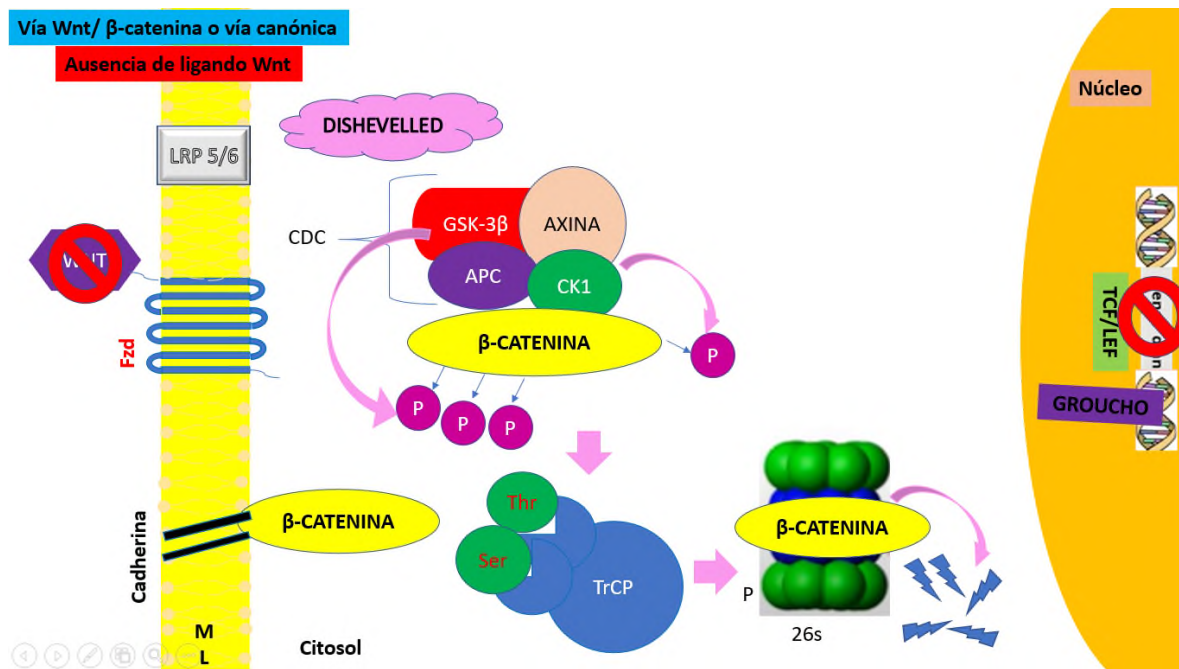
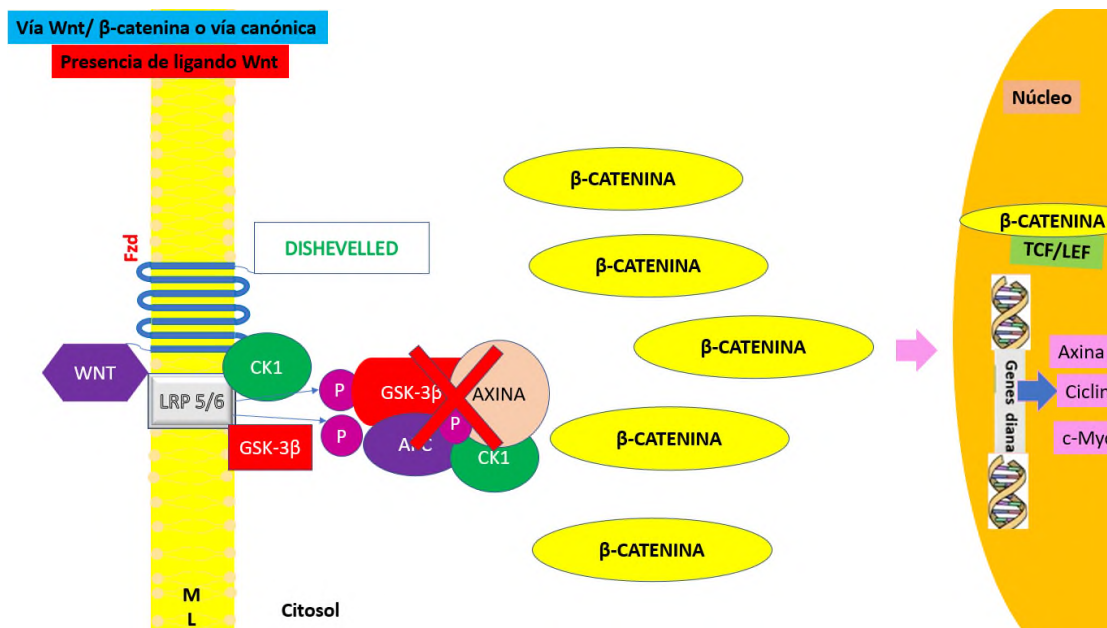


Figura 4. Vía Wnt/ $\beta$ -catenina en ausencia de ligando Wnt

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina (canónica) se activa cuando un factor Wnt como Wnt1, Wnt3 o Wnt3A se unen a su receptor Fz (Frizzled) y a su co-receptor LRP5/6 (proteína relacionada con el receptor de LDL 5/6) en la superficie de la célula. La formación del complejo Wnt-Fz-LDR va a promover la interacción de la proteína citoplasmática de andamiaje Dvl (Dishevelled) con el extremo citoplasmático de Fz dentro del citoplasma. Esta interacción va a inducir primero, el reclutamiento de Axina a la membrana plasmática y segundo, la fosforilación del extremo citoplasmático de LRP5/6. Se ha propuesto que esta fosforilación es mediada por GSK3 $\alpha/\beta$  y CK1, que son reclutadas a la membrana plasmática (Davidson, 2005; Zeng, 2005) y que esta fosforilación va a facilitar la unión de Axina a LRP5/6, estableciendo un bucle positivo de activación.

La Axina es el componente limitante del complejo de destrucción (Lee, 2003), con lo que éste se va a desestabilizar y la  $\beta$ -catenina se va a acumular en el citoplasma translocándose al núcleo a través de mecanismos aún no bien identificados. En el núcleo,  $\beta$ -catenina se une a los factores de transcripción TCF/LEF desplazando a los co-represores TLE/groucho (Daniels, 2005) y se reclutan co-activadores transcripcionales como p300/CBP o Bcl9/Pygo (Mosimann, 2009), activando genes que contienen secuencias de respuesta a Wnt (figura 5).



**Figura 5.** Vía Wnt/ $\beta$ -catenina en presencia de ligando Wnt

Los genes diana clásicos de la vía Wnt, incluyen genes de ciclo celular, como son la ciclinaD1 o el oncogen cMyc (Xu et al., 2020; Ahmed, 2020), pero también incluyen genes de la propia vía Wnt como Axina2, DKK1, LEF1 (que van a facilitar el apagado de la señal mediada por Wnt), genes involucrados en la transición epitelio mesenquima (EMT) como las metaloproteasas de matriz 2 (MT1-MMP), MMP7, MMP9 (Brabletz, 1999; Wu, 2007), TWIST o SLUG y genes implicados en diferenciación como la Queratina1 (K1) o la citoqueratina de pelo 13 (AE13) (Merrill, 2001)

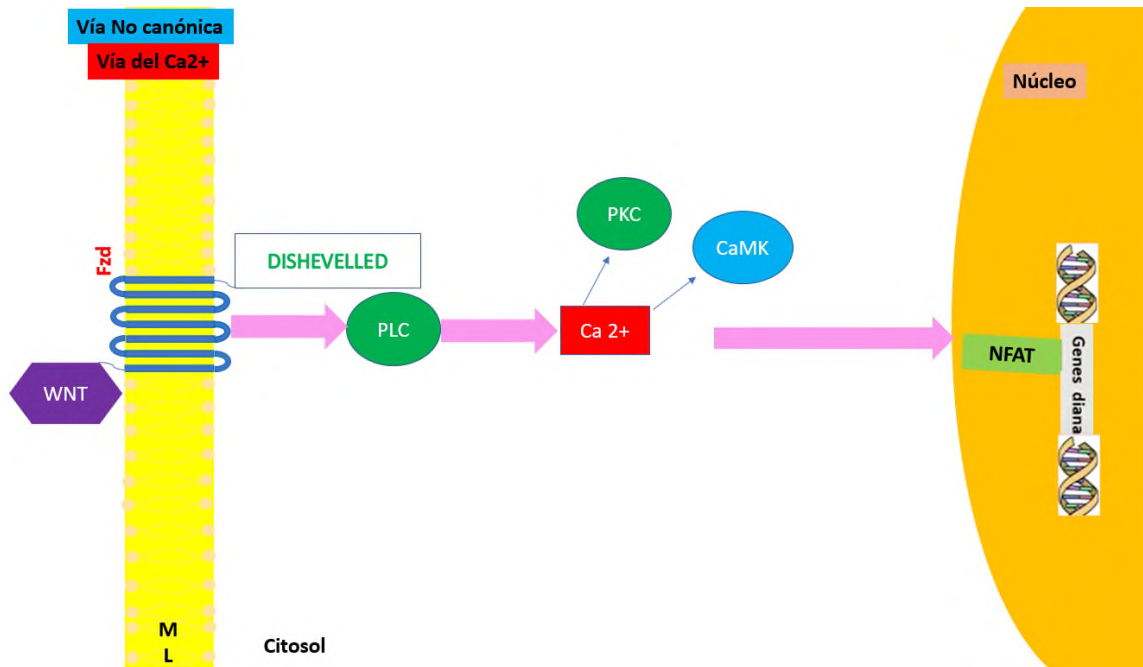
Cuando se evita la unión de la proteína Wnt a la superficie celular, posiblemente por una variedad de inhibidores, la  $\beta$ -catenina se une dentro del complejo GSK- $\alpha/\beta$ , lo que resulta en su fosforilación y posterior degradación por la maquinaria proteosomal. La inhibición de la unión a la proteína Wnt previene así la transcripción de genes. La transcripción del gen activado por  $\beta$ -catenina también puede inhibirse dentro de la vía Wnt canónica por antagonistas dentro del citoplasma y el núcleo.

### **5.1.5 Vías no canónicas o independientes $\beta$ -catenina**

La señalización no dependiente de  $\beta$ -catenina, activada generalmente por una Wnt de las denominadas no canónicas (Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, y Wnt11), presenta dos rutas de señalización intracelular, denominadas vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> o del calcio, y vía Wnt/PCP (Wada, 2009; Nishita, 2010).

En la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> (figura 6), la unión de la proteína Wnt a los receptores Fz de la superficie celular desencadena varios procesos celulares que implican la estimulación de las proteínas G heterotriméricas y de la fosfolipasa C (PLC), provocando el incremento de la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular, una disminución de los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y una activación de las quinasas Ca<sup>2+</sup>/calmodulina proteína quinasa II (CaMKII) y proteína quinasa C (PKC). Estos procesos pueden estimular el factor nuclear AT (NFAT, por sus siglas en inglés) y otros factores de transcripción (Li et al., 2005; Michaelidis y Lie, 2008; Buechling y Boutros, 2011). Esta vía de señalización es importante en procesos de

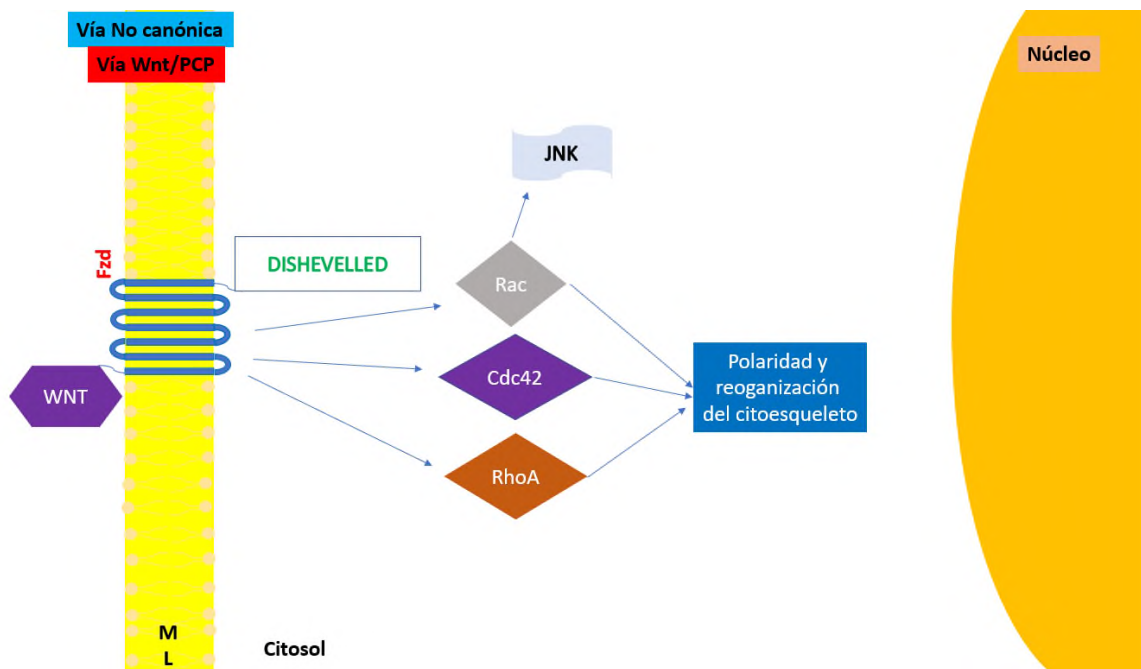
determinación del destino celular, migración celular, extensión convergente y guía axonal (Clark et al., 2012).



**Figura 6.** Vía no canónica Wnt/Ca<sup>2+</sup>

En la vía Wnt/PCP (figura 7), las proteínas Wnt se unen a receptores Fz en la superficie celular, provocando la activación de las GTPasas pequeñas RhoA, Cdc42 y Rac1, que a su vez activan ROCK (*Rhoassociated coiled-coil containing protein kinase*) y la vía de la Jun quinasa N-terminal (JNK) de respuesta frente al estrés, lo cual conduce finalmente a la expresión génica y a la remodelación del citoesqueleto (Li et al., 2005; Michaelidis y Lie, 2008; Buechling y Boutros, 2011). Recientemente, diferentes estudios han demostrado la capacidad de los ligandos Wnt5a y Wnt11 para activar esta cascada de señalización mediante su unión a los receptores no convencionales Ror y Ryk, a través de la activación de JNK y Src respectivamente (Buechling y Boutros, 2011). Esta vía de señalización está implicada en la regulación de la polaridad del tejido durante la gastrulación y en la formación del tubo neural del embrión, y a nivel celular regula procesos de migración celular, crecimiento y guía axonal, sinaptogénesis y ciliogénesis (Clark et al., 2012). Sin embargo, se ha comprobado que ligandos considerados como no canónicos son capaces de activar la vía canónica en determinadas circunstancias. Tal es el caso

del ligando Wnt5a, que es capaz de activar no sólo la señalización mediada por calcio y la JNK, sino también la vía de la  $\beta$ -catenina siempre que esté presente el receptor adecuado, como por ejemplo Fz5 o Fz4-LRP5 (He et al., 1997; Mikels y Nusse, 2006). Por otra parte, también se ha descrito que la JNK está implicada no sólo en la regulación de los movimientos celulares a través de la vía de señalización Wnt/PCP, sino también en la inhibición de la vía canónica mediante la reducción de la  $\beta$ -catenina nuclear (Liao et al., 2006). Por lo tanto, se debe tener en cuenta que determinados ligandos y receptores pueden estar implicados en diferentes vías de señalización, y pueden regular diferentes procesos biológicos originalmente asignados a una vía concreta de señalización, o incluso que diferentes vías pueden actuar al mismo tiempo en un mismo tipo celular, regulándose entre sí (Kestler y Kuh, 2008).



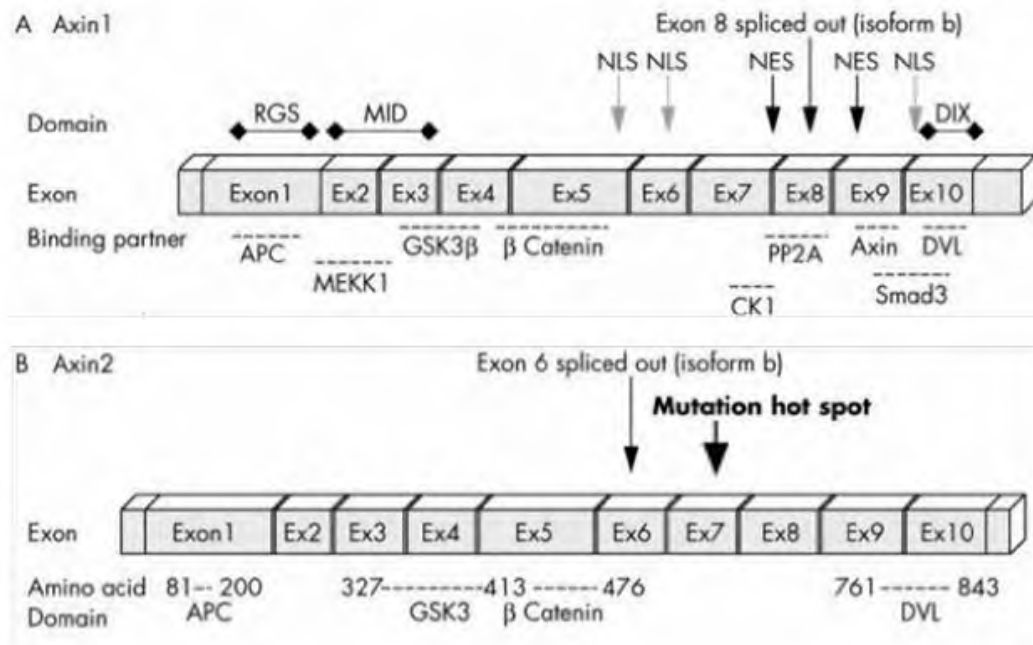
**Figura 7.** Vía no canónica Wnt/PCP

### 5.1.6 Axina

Axina es una proteína de anclaje del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina. Su fosforilación es esencial para su estabilidad, siendo GSK3 $\beta$  responsable de dicha fosforilación. En humanos se conocen dos genes Axina1 y Axina 2 o conductina (figura 8), que a su vez es un gen diana de la propia vía Wnt. Axina1 es un

componente constitutivo del complejo de degradación de  $\beta$ -catenina, ejerciendo un papel de regulador negativo de la vía al mantener los niveles de  $\beta$ -catenina bajos en el citoplasma. Axina2 es un elemento de expresión inducible con un papel inhibidor por retroalimentación (Lustig, 2002). Por otro lado, axina es capaz de moverse entre el núcleo y el citoplasma gracias a sus secuencias NES y NLS (Nuclear Export Signal y Nuclear Localization Signal) pudiendo regular la localización celular de  $\beta$ -catenina junto a APC, aunque dados los bajos niveles de axina, la acumulación de  $\beta$ -catenina, puede llegar a sobrepasar los límites de regulación de axina (Cong, 2004).

Axina actúa como regulador negativo dentro de la vía de señalización de Wnt mediante la reducción de la cantidad de  $\beta$ -catenina disponible para la activación transcripcional (Sakanaka, 1998). En ausencia de señal de Wnt se produce la fosforilación de Axin mediada por GSK3 $\beta$  y el enlace a APC y  $\beta$ -catenina. La activación de la señal de Wnt es transducida por la proteína citoplásmica Dishevelled (Dvl) (Li, 1999). Dvl forma un complejo con Axina (Fagotto, 1999) e induce su desfosforilación. Esto reduce la capacidad de Axina para formar complejos con APC y  $\beta$ -catenina, dando como resultado la acumulación de  $\beta$ -catenina y su activación transcripcional. La modulación de este efecto vía arriba es debido a la presencia de un sitio de unión PP2A en Axin (Hsu, 1999). El complejo Axina PP2A muestra APC desfosforilado en sitios previamente fosforilados por GSK3 $\beta$  y reducción del nivel de  $\beta$ -catenina (Ikeda, 2000).



**Figura 8.** Estructura Genómica de Axina. (A) Axin1 está compuesto de 10 exones. (B) Axin2 se compone de 10 exones que codifican para 843 aminoácidos (aa). De la misma manera que con Axin1, las uniones de Axin2 son APC (aa 81–200), GSK3β (aa 372–413), β catenin (aa 414–476), y Dsh (aa 761–843). Hasta el momento todas las mutaciones encontradas en Axin2 están localizadas en el exón7. APC, adenomatous polyposis coli; CKI, casein kinase I; DVL, Dishevelled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; MEKK1, mitogen activated protein/extracellular regulated kinase kinase kinase 1; NES, nuclear export signal; NLS, nuclear localisation signal; PP2A, protein phosphatase.

### 5.1.7 Caseína quinasa 1a (CK1a)

CK1 es una de las cinasas responsable de la fosforilación de β-catenina. CK1 constituye una familia de serina/treonina cinasas monoméricas presentes en células eucariotas. En mamíferos se han descrito hasta 7 componentes: α, β, γ1, γ2, γ3, δ y ε, cuyos dominios cinasa comparten una identidad de entre el 53 y el 98%. El sitio de fosforilación es pS/T-X-X-X-(S/T), siendo este último residuo el punto diana de fosforilación. Cada una de las isoformas tiene diferentes proteínas diana, y por tanto, diferentes efectos. En la vía Wnt, CK1ε es un regulador positivo mientras que CK1α

actúa como regulador negativo. Sin embargo, existen datos de que otras isoformas puedan participar en la fosforilación de  $\beta$ -catenina. Así se ha descrito que tanto CK1 $\alpha$ , como las isoformas  $\epsilon$  y  $\delta$  pueden fosforilar  $\beta$ -catenina en presencia de axina (Amit, 2002). Por otra parte, CK1 $\epsilon$  puede fosforilar APC (regulando negativamente de la vía) (Rubinfeld, 2001), y Dsh con un incremento de la señalización por  $\beta$ -catenina (Hino, 2003; Bryja, 2007). Finalmente CK1  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$  pueden fosforilar al correceptor LRP6, favoreciendo así la activación de la vía (Zeng, 2005).

### **5.1.8 Glucógeno sintasa quinasa (GSK3)**

GSK-3 (Glucógeno sintasa quinasa) es una serina/treonina cinasa identificada en 1980. En mamíferos se encuentran dos isoformas GSK-3 (51 kDa) y  $\beta$  (47 kDa), Las cuales están codificadas por genes diferentes conocidos como *gsk3* y *gsk3 $\beta$*  respectivamente. Ambas isoformas se expresan de manera ubicua y funcionalmente redundante en diversas vías de señalización incluyendo la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina (Watts, 2005).

GSK-3  $\beta$  es uno de los moduladores negativos más importantes de la señalización mediada por Wnt, y junto con  $\beta$ -catenina, es fosforilado por numerosos factores de transcripción (Vidal, 2010), factor de activación nuclear de células T (NFAT) (Zhang, 2009), neurogenina 2, Smad1, y c-Jun, todos ellos juegan un papel importante en la expresión génica, plasticidad neuronal y supervivencia celular. GSK-3 $\beta$  produce además la inhibición de cAMP en respuesta a la unión a CREB . Además de la expresión génica, GSK-3 $\beta$  está implicada en la morfogénesis celular a través de las regulación de la actividad de varias proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Dowlatshahi, 1999).

Las cinasas GSK-3 son constitutivamente activas, su actividad es regulada por el estado de fosforilación de residuos de serina y tirosina. La actividad disminuye con la fosforilación de Ser9 y aumenta por la fosforilación de Tyr216. La regulación de GSK-3 $\beta$  por elementos de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina actúa principalmente a través de dos mecanismos diferentes. Uno es el modelo de inhibición directa en el cual LRP5/6 inhibe GSK-3 $\beta$  vía interacción proteína-proteína secuestrando su sustrato sin afectar la actividad cinasa per se. El otro mecanismo regulador importante es el

mediado por la inhibición de GSK-3 $\beta$  que conduce a la desestabilización y degradación de Axin y resultando en estabilización de  $\beta$ -catenina. Además, avances recientes indican que GSK-3 $\beta$  también desempeña un papel positivo en la transducción de señales Wnt por fosforilación del receptor LRP5/6. La actividad de GSK-3 $\beta$  es regulada también mediante Akt, que es activado por diferentes moléculas conocidas como PI3K y proteínas G, produciendo la inactivación de GSK-3 $\beta$  por fosforilación del residuo de serina en el dominio Nt (Laifenfeld, 2005).

### **5.1.9 APC**

La proteína Adenomatous polyposis coli (APC) ayuda en el control de la concentración de  $\beta$ -catenina. APC es una proteína con múltiples dominios, codificada en el cromosoma 5q21-22, capaz de interactuar con moléculas tan diversas como los componentes de la vía WNT, microtúbulos, reguladores del citoesqueleto (EB1 y IQGAP1) o Asef1 (factor intercambiador de nucleótidos de guanina). APC es parte integral del mecanismo de señalización de Wnt, pero también juega un papel de interés en la adhesión celular, estabilidad microtubular del citoesqueleto, regulación del ciclo celular y posiblemente en la apoptosis. Además de con  $\beta$ -catenina, APC interactúa y es fosforilada por GSK3 $\beta$  en su región central, lo que a su vez permite una mejor unión de APC a  $\beta$ -catenina (Fearnhead, 2001). Para la regulación de  $\beta$ -catenina, APC construye un complejo con GSK-3 $\beta$  y Axin. Este complejo es capaz de unir  $\beta$  catenina en el citoplasma que se fosforila por CK1 y GSK-3 $\beta$  etiquetando  $\beta$ -catenina para su degradación. Axin parece actuar como proteína de andamiaje en la formación de un complejo de multiproteínas con APC  $\beta$ -catenina, para luego facilitar la fosforilación de APC y  $\beta$ -catenina por GSK3 $\beta$ . La fosforilación de APC resulta en la unión de  $\beta$ -catenina y resultando en el aumento de APC mediado por la fosforilación de GSK3 $\beta$  y la subsecuente degradación de  $\beta$ -catenina (Kawahara, 2000).

### **5.1.10 Moléculas pequeñas moduladoras de la vía Wnt canónica**

Debido a la relación participativa de la vía Wnt en el desarrollo de muchas enfermedades, en especial el cáncer, se ha promovido la investigación para apuntar

a la señalización de Wnt con moléculas pequeñas. En la tabla 1 se proporciona una lista de moléculas publicadas. El objetivo más eficaz y selectivo sería el complejo entre TCF/LEF y  $\beta$ -catenina. Algunos autores mencionan que este objetivo es bastante elusivo, ya que su estructura consiste en una gran superficie de unión que no puede romperse fácilmente con compuestos químicos (Huber, Nelson y Weis, 1997).

Se han propuesto en la literatura que compuestos como PKF115-584 (tabla 1) inhiben la señalización de Wnt en este contexto. Sin embargo, aunque antagonizan de forma potente los efectos celulares de las actividades de la  $\beta$ -catenina *in vitro* e *in vivo*, su especificidad y eficacia deben establecerse más a fondo (Lepourcelent, 2004).

Otro objetivo para bloquear la señalización de Wnt es la inhibición de PORCN, que es una enzima que cataliza la acetilación de las proteínas de Wnt y, por lo tanto, permite su secreción en las células adyacentes (Chen et al., 2009). IWP (tabla 1) es capaz de inactivar PORCN con un alto grado de selectividad. Sin embargo, su uso está limitado a experimentos *in vitro*. Sin embargo, la variante C56 y su derivado avanzado LGK974 de Novartis son útiles para esta aplicación y también mostraron una inhibición efectiva de la señalización de Wnt. LGK974 se está probando actualmente en ensayos clínicos para tratar el adenocarcinoma de páncreas, el cáncer colorrectal mutante del fibrosarcoma rápidamente acelerado (BRAF) y otros tipos de tumores con alteraciones genéticas documentadas (Proffitt et al., 2013; Liu et al., 2013).

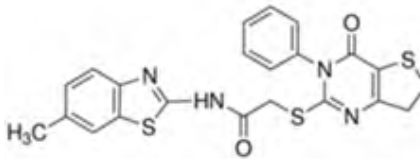
WAY-316606 es una molécula pequeña que evita que SFRP1 se una a los receptores FZD. Por lo tanto, los Wnt pueden interactuar fácilmente con los receptores FZD, lo que aumenta la señalización de Wnt (Bodine et al., 2009).

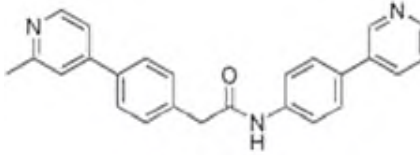
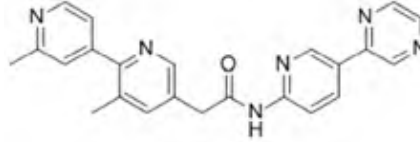
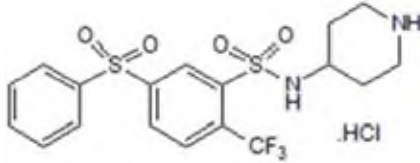
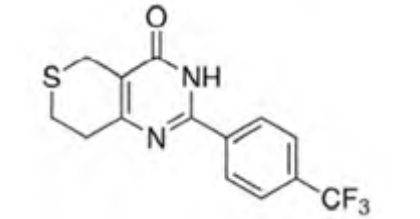
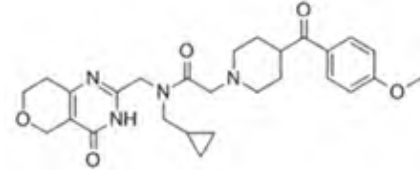
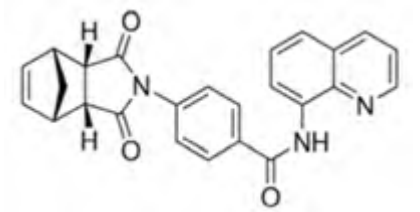
Existen moléculas pequeñas como XAV939 o NVP-TNKS656 que estabilizan la AXIN y, por lo tanto, desestabilizan la  $\beta$ -catenina mediante la inhibición de TNKS. IWR es una molécula pequeña que interactúa directamente con AXIN promoviendo su estabilización. Esta pequeña molécula sólo se ha probado con éxito *in vitro*, se ha informado que NVPTNKS656 también causa una apoptosis más robusta y una actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Schoumacher, 2014).

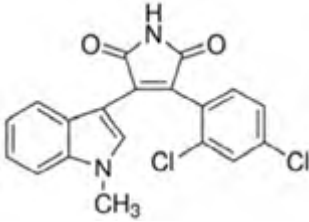
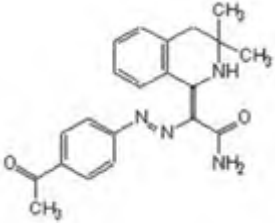
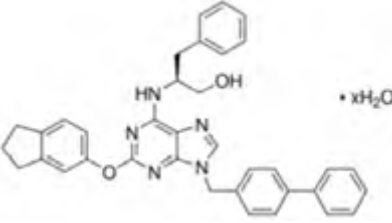
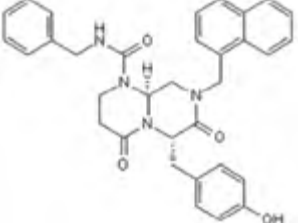
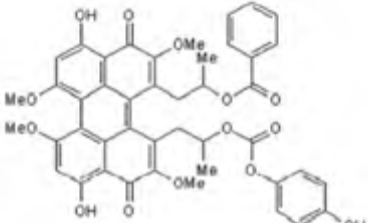
Una de las estrategias más utilizada para afectar la señalización de Wnt es apuntar a GSK3 $\beta$ . Las sustancias químicas como el cloruro de litio (LiCl) pueden activar la enzima que conduce a la fosforilación de la  $\beta$ -catenina unida a AXIN, que a su vez inicia su degradación. En contraste, SB-216763 inhibe GSK3 $\beta$  que provoca la activación de la vía Wnt y, por lo tanto, induce la expresión de un gen informador de  $\beta$ catenina-TCF/LEF en células HEK293. Sin embargo, GSK3 $\beta$  participa en varios eventos de señalización en las células y su orientación tiene efectos pleiotrópicos. Otro activador es IQ1, una pequeña molécula que se dirige a PP2A que facilita la desfosforilación directa de  $\beta$ -catenina. QS11 ciertamente aumenta la vía de WNT al afectar el tráfico de proteínas al inhibir la proteína activadora de GTPasa del factor de ribosilación de ADP 1 (ARFGAP1) (Zhang et al., 2007).

Entonces, de acuerdo a la consulta bibliográfica, se conoce un pequeño conjunto de compuestos químicos que permiten atacar la señalización de Wnt, implicando una mayor investigación de la vía. Sin embargo, su uso es limitado y el desarrollo de más moléculas está en proceso. Dado que nuestra comprensión de la vía de Wnt aún es incompleta, se amplía el espacio para mejorar nuevas moléculas pequeñas y la administración de las existentes. Además, la mayoría de los compuestos sólo son adecuados para estudios in vitro que muestran la necesidad de desarrollar moléculas que también se pueden aplicar in vivo (Emami, 2004).

**Tabla 1.** Moléculas pequeñas moduladoras de la vía Wnt.

Molécula	Estructura	Objetivo	Efecto sobre el objetivo	Efecto sobre la señalización
IWP		PORCN	Inhibe	Inhibe

<b>C59</b>		PORCN	Inhibe	Inhibe
<b>LGK974</b>		PORCN	Inhibe	Inhibe
<b>WAY-316606</b>		SFRP1	Inhibe	Activa
<b>XAV939</b>		TNKS1/2	Inhibe	Inhibe
<b>NVPTNKS65 6</b>		TNKS2	Inhibe	Inhibe
<b>IWR</b>		AXIN2	Activa	Inhibe

SB-216763		GSK3 $\beta$	Inhíbe	Activa
IQ1		PP2A	Activa	Activa
QS11		ARFGAP 1	Activa	Activa
ICG-001		CBP	Inhíbe	Inhíbe
PKF115-584		TCF/LEF/ $\beta$ - catenina	Inhíbe	Inhíbe

## **5.2. Inhibición del acoplamiento de la proteína $\beta$ -catenina/TCF a través del fármaco o-hidroxicinamaldehído.**

En estudios que datan del año 2013 se han investigado las actividades antitumorales del o-hidroxicinamaldehído, un fenilpropanoide aislado de la corteza de *Cinnamomum cassia*, utilizando células de cáncer colorrectal humano.

Para identificar nuevos reguladores de moléculas pequeñas de la vía de señalización de Wnt /  $\beta$ catenina (Lee et al., 2013). Evaluaron varios productos naturales utilizando un ensayo de gen indicador TOPflash basado en células embrionarias de riñón humano HEK293. El TCF/LEF contiene dos conjuntos de tres copias del sitio de unión del promotor mínimo de timidina quinasa (TK) y marco de lectura abierto de luciferasa (TOPflash , pGL3-OT). Sin embargo, FOPflash (pGL3-OF) contiene sitios de unión a TCF/LEF mutados y, por lo tanto, se usa como control negativo.

Los TCF/LEF comprenden una familia de activadores transcripcionales que se unen al ADN y que son esenciales para el desarrollo de las células linfoides. Estos factores de transcripción son activados por la vía Wnt. En particular, TCF/LEF se localiza principalmente en el citoplasma y se transloca al núcleo unido a la  $\beta$ -catenina de manera cooperativa.

Se ha reportado que o-hidroxicinamaldehído inhibe el gen indicador TOPflash de manera dependiente de la concentración. Para confirmar adicionalmente la especificidad de o-hidroxicinamaldehído a la señalización de Wnt /  $\beta$ -catenina, se evaluó la actividad informadora de TOPflash y FOPflash en células HEK293. Aunque el compuesto inhibió la actividad de TOPflash de una manera dependiente de la concentración, esta sustancia no afectó la actividad de FOPflash, que contiene mutaciones en sus sitios de unión a TCF/LEF. Estos resultados sugieren que el o-hidroxicinamaldehído es un inhibidor específico de la actividad transcripcional que responde a Wnt /  $\beta$ -catenina / TCF.

Para dilucidar aún más si el efecto supresor del fármaco sobre la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina/TCF está asociado con la unión de los complejos  $\beta$ -catenina/TCF a las regiones promotoras del ADN, ensayos reportados de cambio

de movilidad electroforética para investigar el cambio potencial en el ADN han mostrado que el o-hidroxicinamaldehído inhibió eficazmente la unión de ADN a TCF/LEF a través del sitio de unión de TCF/LEF. Estos hallazgos sugieren que o-hidroxicinamaldehído suprime la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina/TCF en células HCT116 al inhibir la unión entre el ADN y los complejos de  $\beta$ -catenina / TCF.

Esto quiere decir, que el o-hidroxicinamaldehído incide dentro de la vía en la inhibición del acoplamiento de la  $\beta$ -catenina y TCF/LEF, por tanto la concentración de  $\beta$ -catenina en el citoplasma aumentaría, se podría dar la traslocación de esta proteína al núcleo pero no se daría la unión de la  $\beta$ -catenina con el TCF/LEF, puesto que el fármaco ya se habría unido al sitio catalítico de la  $\beta$ -catenina.

Los niveles de ARNm de genes diana de Wnt como CCND1 (ciclina D1) y CMYC (c-myc), que también son componentes esenciales de las vías de señalización de la progresión del ciclo celular y la proliferación celular, se ven afectados siendo regulados por o-hidroxicinamaldehído en las células HCT116. Además, el tratamiento con o-hidroxicinamaldehído disminuye los niveles de expresión de ARNm de MMP7 (gen mmp7) y PLAU (gen activador del plasminógeno de uroquinasa), que son genes diana de Wnt que se sabe que están relacionados con la invasividad y la movilidad de las células cancerosas. Los niveles de ARNm de AXIN2, NKD1 y DKK1, todos los cuales se sabe que son genes diana de Wnt, también son suprimidos. Estos resultados demostraron que el compuesto 1 es capaz de inhibir la proliferación de células cancerosas y la invasividad en el colon activado por Wnt células cancerosas mediante la inhibición de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. Diversos análisis han revelado que la regulación a la baja de CCND1 y CMYC por o-hidroxicinamaldehído suprime la expresión de proteínas de ciclina D1 y c-myc. Los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina total también es regulada negativamente por o-hidroxicinamaldehído, lo que implica que los efectos inhibidores de o-hidroxicinamaldehído podrían estar asociados con la regulación negativa de la  $\beta$ -catenina (Mlodzik y Trends, 2002).

### 5.2.1 *Cinnamomum Cassia* Blume

El o-hidroxicinamaldehído se extrae de la *Cinnamomum Cassia* Blume (Lauraceae, figura 9), que es un árbol perennifolio nativo del sur de China e Indochina este de Birmania. Como es muy similar a la canela (*Cinnamomum zeylanicum*, conocido como "canela verdadera" o "canela de Ceylán"), se emplea principalmente como condimento aromático o especia en los países de Asia oriental, y también se considera que tiene propiedades farmacológicas como carminativo y antiespasmódico, por lo que a menudo se ha combinado con otras hierbas medicinales orientales tradicionales (Lee, 2002).



**Figura 9.** Planta *Cinnamomum Cassia* Blume

El árbol de la cassia llega a crecer de 10-15 m de altura, posee una corteza grisácea, y las hojas pueden llegar a los 10-15 cm de largo, y tienen un color rojizo cuando son jóvenes. La corteza, las ramitas y las hojas tienen un olor muy fuerte.

Las ramas redondas de tallo de un año tienen una corteza de color marrón oscuro con rayas a lo largo y un poco vellosa. Las ramitas más o menos cuadradas de este año tienen una corteza de color marrón amarillento que está rayada longitudinalmente y un pelo tomentoso densamente amarillo grisáceo.

Las yemas terminales son relativamente pequeñas con un tamaño de unos 3 mm. Las escamas de las yemas superpuestas, parecidas a tejas, tienen una forma de huevo amplia con un extremo superior puntiagudo y un pelo tomentoso densamente amarillo grisáceo (Wu, 2008).

Las hojas alternas hasta casi constantemente dispuestas en las ramas se dividen en pecíolo y limbo. El pecíolo fuerte, de 1,2 a 2 cm de largo, es tomentoso amarillo

peludo (tricomas) y plano en la parte superior o ligeramente surcado en la parte inferior. La lámina de la hoja, simple y coriácea, suele ser de 8 a 16, rara vez hasta 34 cm y un ancho de 4 a 5,5, rara vez hasta 9,5 cm de elíptica estrecha a casi lanceolada con una base de la lámina puntiaguda y un extremo superior ligeramente puntiagudo. El margen de la hoja está libre de clorofila y está enrollado hacia arriba. El envés de la hoja es verdoso opaco con pelos amarillos tomentosos y el envés es verde brillante y desnudo. Hay tres principales venas foliares. La vena central y en la zona inferior también las otras dos venas principales están claramente levantadas en la parte inferior de la hoja y claramente hundidas en la parte superior. Las dos arterias principales laterales surgen de 5 a 10 mm por encima de la base de la pala e inicialmente corren casi opuestas entre sí, se elevan en un arco y luego desaparecen por debajo de la punta de la pala. Fuera de las dos arterias laterales principales hay muchas arterias laterales que están conectadas en un arco. Las nervaduras transversales de las hojas son onduladas y casi paralelas con una distancia de 3 a 4 mm; están claramente levantadas en la parte inferior de la hoja y apenas reconocibles en la parte superior y están conectadas con pequeñas nervaduras de las hojas que solo son reconocibles en la parte inferior de la hoja (Khan et al., 2003).

### **5.2.2 Taxonomía y principio activo de la *Cinnamomum Cassia***

La *Cinnamomum cassia* fue publicado por primera vez en 1753 bajo el nombre *Laurus cassia* por Carl von Linné en *Species Plantarum*. La nueva combinación de *Cinnamomum cassia* (L.) fue publicada en 1825 por David Don en *Prodromus Florae Nepalensis*. El género *Cinnamomum* es un nombre genérico que proviene del griego *Kinnamon* o *Kinnamomon*, que significa *madera dulce*. Este término griego probablemente proviene del hebreo *quinamom*, el cual tiene origen en una versión anterior al término *Kayu manis*, que en el lenguaje de Malasia e Indonesia también quiere decir *madera dulce*.

El epíteto *cassia* tiene su origen en la palabra griega *κασία* *Kasia*. Este nombre griego es probablemente un préstamo de los comerciantes de habla semítica (hebreo antiguo קציעה *qetsiiah*). Se supone que estos nombres para esta especie fueron adoptados de su origen chino. Podría haber una conexión con la gente del

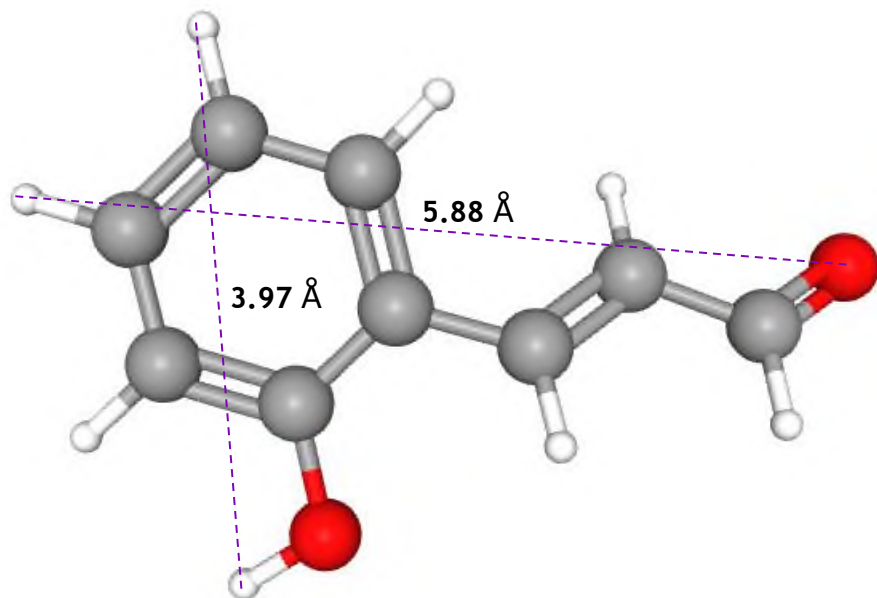
noreste de India de los Khasi, que se establecieron en las montañas Khasi en Meghalaya y Assam , así como en Bangladesh, donde se menciona por primera vez alrededor del 1500 d.C. El nombre también podría derivarse originalmente de la palabra sumeria *gazi* (acadio *kasû*), esta palabra describe una especia cuya traducción es “canela”, “regaliz” o “mostaza” (Hermann, 2013).

La corteza de este árbol produce un 2% de aceite esencial que contiene un 90% de trans-cinamaldehído y muy poco eugenol. Se han descrito diversos diterpenos (cincassioles, cinceilanina), derivados fenilpropánicos, lignanos furanofuránicos, polisacáridos, heterósidos mono y sesquiterpénicos y numerosos derivados flavánicos presentes en esta planta (Varsha, 2012).

### **5.2.3 Compuesto o-hidroxicinamaldehído.**

En 1998 Koh y colaboradores encontraron que el extracto de *C.Cassia* mostró un efecto inhibitor sobre la actividad de la proteína *farnesil transferasa in vitro*, que se relaciona con la activación de las células inmunes así como con la carcinogénesis (Koh *et al.*, 1998).

Estos efectos antitumorales se han atribuido a los cinamaldehídos (CA) como el o-hidroxicinamaldehído, cuya estructura química se muestra en la figura 10. Este compuesto es un fenilpropanoide que puede aislarse de la corteza de *Cinnamomum cassia* Blume (Lauraceae) (Choi, *et al.*, 2001). Se ha reportado que exhibe actividades biológicas antiangiogénicas, antiinflamatorias y antiagregantes plaquetarias, así como actividades antiproliferativas o proapoptóticas en varias líneas celulares cancerosas, como las células cancerosas de piel, ovario y colon (Hermann, 2013).



**Figura 10.** Estructura del o-hidroxicinamaldehído.

El o-hidroxicinamaldehído es un compuesto de estructura casi plana con dimensiones de 3.97 Å y 5.88 Å como se muestra en la figura 2, lo que la hace una molécula pequeña con dimensiones adecuadas para ser almacenada dentro de otras moléculas más grandes. Presenta masa molar de 148.16 g/mol y una fórmula molecular de  $C_9H_8O_2$ , los átomos de oxígeno en color rojo de la figura se encuentran presentes en los grupos hidroxilo y aldehído del compuesto, la parte hidrofílica que puede formar puentes de hidrógeno, sin embargo, la parte hidrofóbica es grande por lo que o-hidroxicinamaldehído posee baja solubilidad. Se ha reportado que es altamente tóxico e irritable, presentando una dosis letal media (DL50) de 750 mg/kg, un valor comparable al del arsénico metálico (DL50 de 763 mg/kg), el cual desde la antigüedad se sabe que es extremadamente tóxico. Estos datos anulan la posibilidad de administrarlo por vía oral mediante el uso de pastillas y su aplicación mediante la inyección no es posible por la baja solubilidad del compuesto, que hace muy riesgoso su uso (Ismail, 2013).

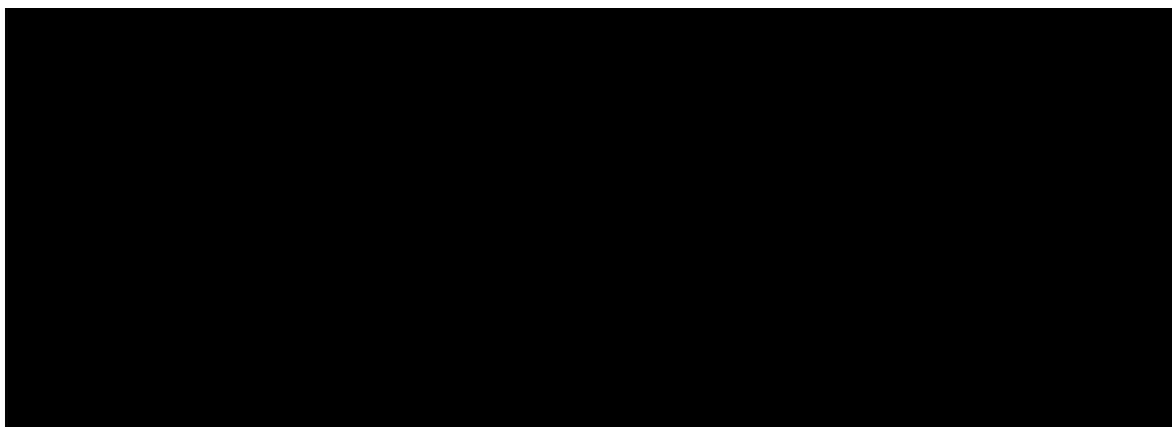
Los estudios acerca del o-hidroxicinamaldehído son muy pocos, además, dejó de ser investigado desde el 2013 por la alta toxicidad que demostró tener, sin embargo, en este trabajo se propone el encapsulamiento de este compuesto para su

administración en la vía de señalización wnt/ $\beta$ -catenina. Las moléculas que se proponen son las ciclodextrinas, estudios recientes han demostrado que son útiles para el transporte de fármacos al citoplasma de las células.

### 5.3 Ciclodextrinas

Dentro de las moléculas que se han propuesto en la literatura para aumentar la solubilidad y encapsular moléculas para su transporte en diversos sistemas, se encuentran las ciclodextrinas, macromoléculas ideales para el transporte del o-hidroxicinamaldehído formando complejos de inclusión que puedan liberar el fármaco en su destino de manera adecuada y segura para el organismo.

Las ciclodextrinas (CDs) son un grupo natural de oligosacáridos cíclicos formados por seis ( $\alpha$ -CDs), siete ( $\beta$ -CDs) u ocho ( $\gamma$ -CDs) unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4)(figura 11). En ocasiones se les llama "cicloamilosas" y se obtienen como resultado de una reacción de la enzima ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) de la bacteria *Bacillus macerans* descubierta en 1905 por Schardinger en la degradación del almidón por transglicosilación intramolecular (Villiers, 1891; Eastburn y Tao, 1994).

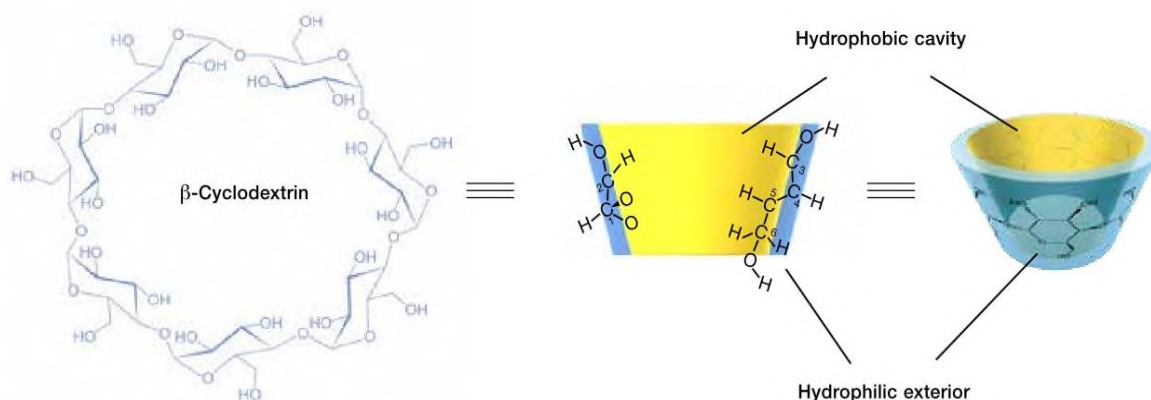


**Figura 11.** Estructura de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs

En 1891 Villiers las descubrió, ya que obtuvo una pequeña cantidad de dextrinas, al observar la ingesta de almidón por parte del *Bacillus amylobacter*, obteniendo aproximadamente 3 g/kg de almidón. En su trabajo se reportó que tras un tiempo en alcohol se observaba la presencia de precipitados cristalinos que correspondían

a la estructura  $(C_6H_{10}O_5) \cdot 3 H_2O$ . Probablemente y de acuerdo con otros autores, Villiers observó que las CDs se produjeron por la contaminación de *Bacillus macerans*.

En 1903, Schardinger obtuvo dextrinas A y dextrinas B en forma de precipitados cristalinos sin poder reductor (Villiers, 1891; Eastburn y Tao, 1994). Años más tarde, en 1911, observó que la *Bacillus macerans* era capaz de producir dextrinas cristalinas a partir de almidón (25-30%). Las nombró dextrina cristalina  $\alpha$  y dextrina cristalina  $\beta$ , pero la dextrina cristalina se aisló hasta 1935. La estructura de las  $\gamma$ -CDs se pudo corroborar en 1942 por cristalografía. Mientras que en 1948 se logró observar la estructura de las  $\gamma$ -CDs mediante difracción de rayos X, afirmándose que las CDs son capaces de formar complejos de inclusión. Las ciclodextrinas se asemejan a un cono o cubo hueco truncado, y es esta estructura tridimensional lo que las hace tan interesantes. Los grupos hidroxilo secundarios en C2 y C3 de las unidades de glucosa se dirigen hacia la abertura superior más ancha, mientras que los grupos hidroxilo primarios en C6 se encuentran alrededor de la abertura inferior más estrecha, lo que hace que el exterior sea hidrófilo. Los grupos C-H asociados y el anillo de enlaces glucosídicos de oxígeno se dirigen al interior de la cavidad, lo que produce su carácter hidrófobo (figura 12) (Szejtli, 1982).



**Figura 12.** Estructura de una  $\beta$ -ciclodextrina.

En los años 1954-1957, Cramer y French se centraron en determinar las propiedades físicas y químicas de las ciclodextrinas. French y su grupo de trabajo

descubrieron otras CDs que contenían un mayor número de glucosa que en 1961 fueron denominadas como  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ - y  $\eta$ -CDs (9-12 residuos) (Hirose y Yamamoto, 2001).

French, en 1957 publicó la primera revisión de CDs y en ella se habló por primera vez de la toxicidad de las CDs (French, 1957). En 1968 dicha información fue corroborada por Caesar (Caesar, 1968).

En 1981 debido a muchos años anteriores de investigación se realizó el primer congreso internacional de CDs, decidiendo organizar este evento cada dos años.

### 5.3.1 Propiedades y aplicaciones de las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son cristalinas, homogéneas, no higroscópicas, no tóxicas con forma truncada y están formadas por unidades de glucopiranosas. Se utilizan en muchas industrias y tienen muchas aplicaciones prácticas, incluidas las siguientes: comida, suplementos dietéticos, farmacéutica, cosmética, soluciones agroquímicas, catálisis, textiles, pinturas y polímeros.

Un uso comercial de las ciclodextrinas se encuentra en los alimentos, cosmética y en el aseo personal en desodorantes de barra contrarrestando olores de la degradación microbiana del sudor (Walter, 2000; Buschman y Schollmeyer, 2002)

En la industria farmacéutica se utilizan para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles agua. Estas moléculas de principio activo se introducen en la cavidad hidrofóbica de las CDs para su transporte hasta su liberación en el lugar de su actuación, mejorando su biodisponibilidad.

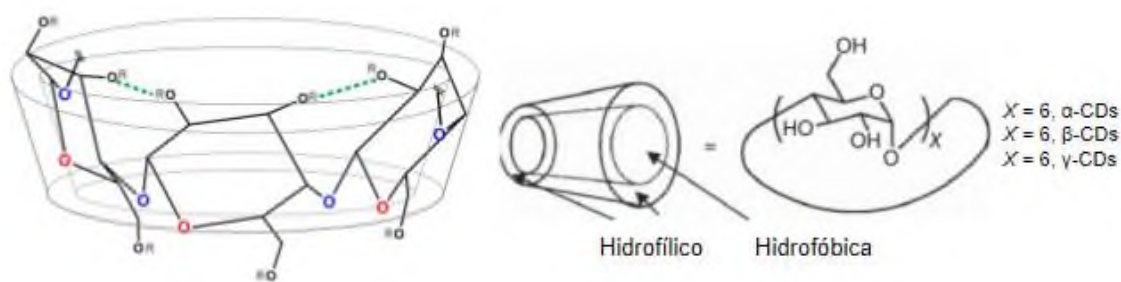
Las principales características de las ciclodextrinas  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - se describen en la tabla 2 (Froming y Szejtli, 1993).

**Tabla 2.** Principales propiedades de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs.

Propiedades	$\alpha$ -CDs	$\beta$ -CDs	$\gamma$ -CDs
Unidades de glucopiranosas	6	7	8

Masa molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidad en agua a 25 °C (% p/v)	14.5	1.85	23.2
Diámetro exterior (Å)	14.6	15.4	17.5
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7 - 5.3	6.0 - 6.5	7.5 - 8.3
Altura de la cavidad (Å)	7.9	7.9	7.9
Volumen de la cavidad (Å <sup>3</sup> )	174	262	427

De estos tres tipos de ciclodextrinas también conocidas como ciclodextrinas de primera generación o parentales la  $\beta$ -ciclodextrina es la más accesible, el precio más bajo y, en general, la más útil. En el lado donde se encuentran los grupos hidroxilo secundarios, la cavidad es más ancha que en el otro lado donde la rotación libre de los hidroxilos primarios reduce el diámetro efectivo de la cavidad. Todos los grupos hidroxilo secundarios están situados en uno de los dos bordes del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios se colocan en el otro borde, por lo que los CD tienen un cono truncado en forma de nuez o corona (figura 13).



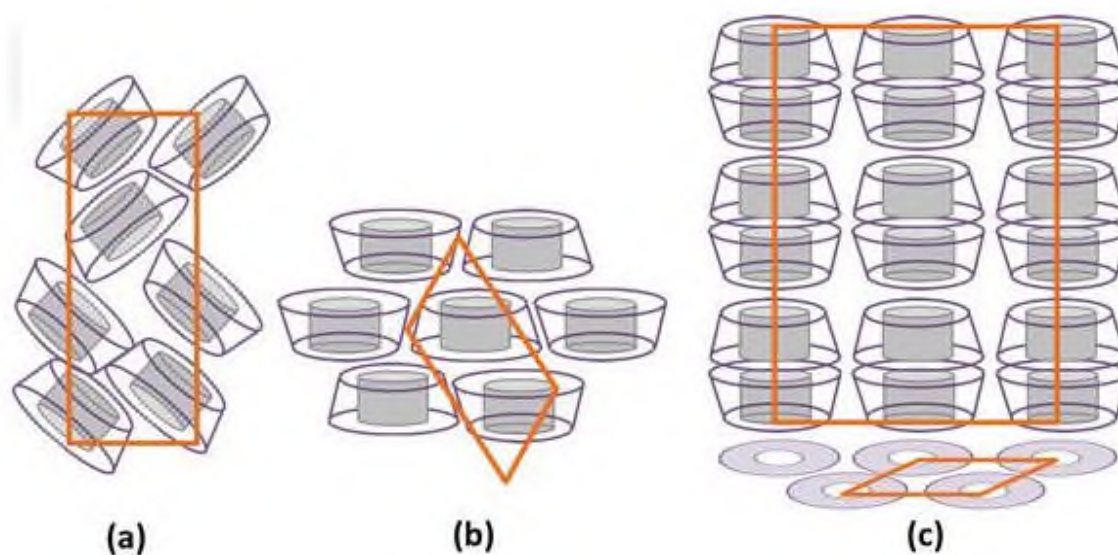
**Figura 13.** Diagrama esquemático de ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas poseen una alta densidad de electrones y un carácter de base de Lewis debido a los pares de electrones no enlazantes de los puentes glucosídico-oxígeno que se dirigen hacia el interior de la cavidad. Mientras que los enlaces de

Hidrógeno determinan la rigidez de las CD. En  $\alpha$ -CD, una unidad de glucopiranososa está en posición distorsionada y el cinturón de enlace H está incompleto, pero en  $\beta$ -CD, se forma un enlace H intramolecular secundario completo que causa una estructura rígida y la menor solubilidad en agua de  $\beta$ -CD entre todas las Ciclodextrinas. La  $\gamma$ -CD tiene una conformación no coplanar y más flexible; por lo tanto, es el más soluble de los tres tipos de ciclodextrinas.

De acuerdo al tipo de ciclodextrina y el compuesto huésped, el complejo de inclusión de ciclodextrinas tiene tres tipos de empaquetamiento de cristales: estructuras de canales, estructuras de capas y estructuras de jaulas (figura 14).

Los derivados de ciclodextrina se han sintetizado mediante aminaciones, esterificaciones o eterificaciones de grupos hidroxilo primarios y secundarios de las ciclodextrinas; y su solubilidad suele ser diferente de la de sus ciclodextrinas originales. Se ha cambiado el volumen de la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas. Esto puede mejorar la solubilidad, la estabilidad frente a la luz o el oxígeno y ayudar a controlar la actividad química de las moléculas huésped.



**Figura 14.** Representación esquemática de estructuras de empaque de (a) tipo jaula; (b) CD de tipo capa; y (c) cristales de CD de tipo canal.

### **5.3.2 Derivados de las ciclodextrinas.**

A partir de las ciclodextrinas nativas (originales) se ha logrado realizar modificaciones químicas o derivaciones de las CDs, esto se realizó inicialmente hace muchos años para aumentar la solubilidad de la  $\beta$ -CD en agua.

En general, las ciclodextrinas y sus derivados hidrófilos solo pueden penetrar membranas biológicas lipófilas, con considerable dificultad. Incluso las ciclodextrinas algo lipofílicas metiladas al azar no penetran fácilmente en las membranas lipofílicas e interactúan más fácilmente con las membranas que los derivados de ciclodextrina hidrofílicos

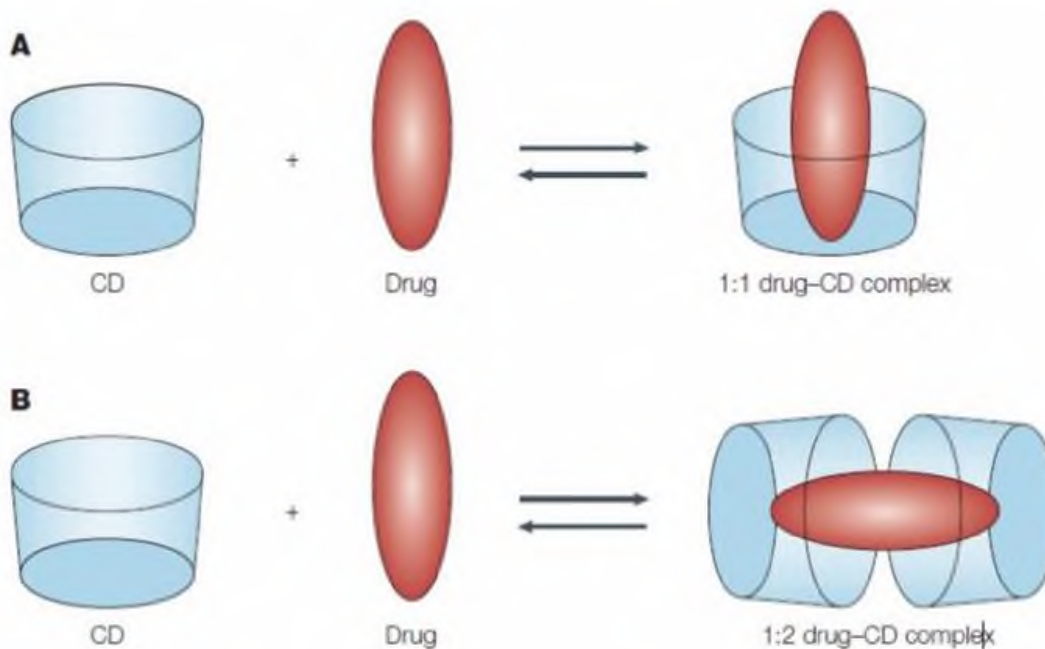
Los derivados de las CDs pueden clasificarse como éteres o ésteres, al realizarse la modificación sobre la ciclodextrina original, solo se afecta a los grupos hidróxilo externos, sin afectar la cavidad hidrofóbica interna. Hasta la fecha las  $\beta$ -CDs son las que más se han modificado con aproximadamente 20 sustituyentes diferentes (Favre et al., 2018).

### **5.3.3 Complejos de inclusión**

El término "compuesto de inclusión" también se conoce en la literatura como aducto, clatrato, compuesto molecular y complejo.

Las ciclodextrinas son capaces de albergar moléculas hidrófobas en su cavidad interior, formando complejos (anfitrión-huésped) de inclusión, manteniendo a la molécula huésped encapsulada por la ciclodextrina (figura 15). De esta forma, se pueden obtener compuestos cristalinos con moléculas orgánicas huésped en estado sólido, líquido y gaseoso (Szejtli, 2004).

Así moléculas insolubles en agua pueden llegar a ser completamente solubles mediante un tratamiento con disoluciones acuosas de ciclodextrina, sin que se produzca modificación química alguna en la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre la ciclodextrina y la molécula insoluble en agua.



**Figura 15.** Esquema de la formación de un complejo de inclusión. **A/** 1:1 Complejo fármaco-ciclodextrina. **B/** 1:2 Complejo fármaco-ciclodextrina.

#### 5.3.4 El modelado molecular y las ciclodextrinas

Actualmente los métodos de modelado molecular constituyen un conjunto de herramientas y algoritmos computacionales que se utilizan para arrojar luz sobre los fenómenos relacionados con las interacciones intermoleculares y su dependencia conformacional y energética. En particular, estas técnicas han encontrado una amplia utilidad para el estudio y caracterización de los complejos de ciclodextrinas. Un uso del modelado computacional es el reconocimiento de huéspedes de las ciclodextrinas que con frecuencia se somete a análisis y predicción *in silico*. Por ejemplo, la afinidad diferencial de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs ha sido estudiada en detalle por Ren y su grupo de trabajo utilizando técnicas de modelado molecular con el fin de determinar la aplicabilidad de ciclodextrinas en remediación de suelos. En este estudio, no solo se exploró la capacidad diferencial de los CD naturales para secuestrar contaminantes ambientales mediante la aplicación de alta afinidad e inclusión selectiva en la cavidad hidrófoba, sino que también fue posible una comprensión detallada del modo de inclusión (Schlick, 2013).

Se ha explorado el uso de complejos de inclusión de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs con antioxidantes carnosol y ácido carnósico como potenciador de su actividad. Cerón utilizó cálculos combinados de acoplamiento y QM, incluido el enfoque híbrido ONIOM, para evaluar con precisión estas características (Cerón-Carrasco *et al.*, 2016).

Suárez y su equipo de trabajo realizaron un estudio de dinámica molecular de 5 ms para explorar el espacio conformacional accesible a las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs, describiendo características estructurales y dinámicas específicas para cada ciclodextrina (Suárez *et al.*, 2017).

El comportamiento estructural y energético asociado a la unión de moléculas huésped a CDs se ha estudiado muy activamente mediante métodos de modelado molecular, incluido el acoplamiento molecular. análisis de dinámica molecular y energía libre de enlace (Wang *et al.*, 2015).

Algunos estudios de modelado molecular ha involucrado simulaciones de dinámica molecular sensibles al pH, tal como Swiech y colaboradores que incluyeron el fármaco anticanceroso doxorubicina como molécula huésped en un derivado de  $\beta$ -CD con ácido lipoico, en este proyecto se predijo la inclusión del fármaco a pH 7.4, mientras que a pH 5.5 se observó la formación de un complejo de auto-inclusión en el que el ácido lipoico estaba enterrado en la cavidad hidrófoba de la CD, provocando así la liberación del fármaco incluido (Swiech *et al.*, 2016).

Con lo mencionado anteriormente es evidente que la química computacional y su relación con las ciclodextrinas ha evolucionado enormemente en los últimos años. y seguirá creciendo exponencialmente en los próximos años.

### **5.3.5 Fármacos comerciales.**

Las ciclodextrinas actúan como anfitriones de fármacos que ayudan en el aumento de solubilidad, lo que permite el transporte de éstas hasta la superficie de las membranas celulares de tejidos como la piel y la mucosa. Esta capacidad de actuar como vehículos.

moleculares y potenciadores de la penetración, aumentan la disponibilidad del fármaco en la superficie de la membrana.

Actualmente se cuenta con formulaciones exitosas de fármacos desarrollados con CDs en el mercado. La tabla 3, recopila algunos de estos (Loftson y Cols, 2005).

**Tabla 3.** Fármacos comerciales elaborados con ciclodextrinas.

Fármaco	Vía de administración	Nombre comercial	Compañía
<b><math>\alpha</math>-Ciclodextrina</b>			
Alprostadiil	Intravenosa	Provastatin	Ono ( Japón)
Cefotiam hexetil HCl	Oral	Pansporin T	Takeda (Japón)
<b><math>\beta</math>-Ciclodextrina</b>			
Benexato HCl	Oral	Ulgut, Lonmiel	Teikoku Kagaku Sangyou (Japón)
Dexametasona	Dérmica	Glymesason	Fujinaga (Japón)
Nicotina	Sublingual	Nicorette	Pharmacia (Suecia)
Nitroglicerina	Sublingual	Nitropen	Nihon Kayaku (Japón)
Piroxicam	Oral	Brexin	Chiesi (Italia)
Ácido tiaprofénico	Oral	Surgamyl	Roussel-Maestrelli (Italia)
<b>2-Hidroxiopropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</b>			
Ciprasida	Rectal	Propulsid	Janssen (Bélgica)
Indometacina	Oftálmica	Indocid	Chauvin (Francia)
Itraconazol	Oral, intravenosa	Sporanox	Janssen (Bélgica)
Mitomicina	Intravenosa	Mitozytrex	SuperGen (EE.UU)
<b>Aleatoria metilación <math>\beta</math>-Ciclodextrina</b>			
17 $\beta$ -Estradiol	Nasal	Aerodiol	Servier (Francia)
Cloranfenicol	Oftálmica	Clorocil	Oftalder (Portugal)

<b>Sulfobutiléter <math>\beta</math>- Ciclodextrina</b>			
Voriconazol	Intravenosa	Vfend	Pfizer (EE.UU)
Maleato de ziprasidona	Intramuscular	Geodon, Zeldox	Pfizer (EE.UU)
<b>2-Hidroxiopropil-<math>\gamma</math>- ciclodextrina</b>			
Diclofenaco sódico	Oftálmica	Voltaren	Novartis (Suiza)

#### 5.4 Dinámica molecular

La modelización molecular también denominada simulación de dinámica molecular es la ciencia que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para estudiar la estructura molecular y su función a través de la construcción de modelos. Esta construcción de modelos puede ser tan simple como moldes de plástico o varillas de metal, o tan sofisticado e interactivo como, gráficos animados en color y esculturas de fabricación láser de madera (Schlick, 2013).

La dinámica molecular (MD) se puede denominar como la "mecánica estadística por números" así como "la visión de Laplace de la mecánica newtoniana" en supercomputadoras. La dinámica molecular es el término utilizado para describir la solución de la ecuación clásica de movimiento (ecuaciones de Newton) para un conjunto de átomos y moléculas en un sistema de partículas que interactúan durante sus trayectorias, donde las fuerzas entre las partículas y sus energías potenciales a menudo se calculan utilizando potenciales interatómicos o campos de fuerza de la mecánica molecular. En dinámica molecular, las partículas se mueven a velocidad constante entre colisiones perfectamente elásticas, y es posible resolver el problema dinámico dentro de los límites impuestos por la precisión del ordenador. La simulación por computadora ha sido una herramienta muy poderosa para atacar muchos problemas corporales en física estadística, química física y biofísica. También puede ayudar mucho al proporcionar información suficiente sobre las propiedades microscópicas de los sistemas complejos de interés. Las simulaciones

por computadora proporcionan resultados "exactos" para los problemas que, de otro modo, sólo serían solubles por métodos aproximados, o podrían ser bastante intratables. Por lo tanto, las simulaciones por computadora se pueden utilizar para probar teorías aproximadas. Los resultados de las simulaciones por computadora también se pueden comparar con un experimento real de lo que se pueden usar para probar el modelo subyacente. La simulación ofrece conocimientos al experimentador para interpretar nuevos resultados sobre la base de detalles microscópicos del sistema (Gago, 2009; Jensen, 2006).

El propósito de las simulaciones por computadora es conectar el mundo microscópico con el mundo macroscópico del laboratorio. Así es posible obtener datos de un sistema microscópico (masas de átomos constituyentes e interacción entre ellos), se obtienen propiedades macroscópicas medibles en experimentos, como la ecuación de estado, constante de difusión, funciones de correlación, etc. La simulación también se utiliza para estudiar propiedades bajo temperaturas y presiones extremas, que pueden ser difíciles o imposibles de llevar a cabo experimentalmente.

#### **5.4.1 Historia de la simulación.**

El primer antecedente de de simulación molecular tiene lugar en 1953, donde Metropolis y colaboradores calcularon la ecuación de estado para la esfera rígida en dos dimensiones usando el método de MonteCarlo (Metropolis, 1953). Posteriormente Fermi, Pasta y Ulam en su trabajo numérico probaron la ergodicidad en un sistema de osciladores acoplados (Fermi, Pasta y Ulam, 1955). Alder y Wainwright realizaron la primera simulación de MD en 1957 en un sistema de esfera dura estudiando la transición de fase (Alder y Wainwright, 1957). A esto le siguió el estudio de daños por radiación en cobre de Vineyard y colaboradores en 1960 (Gibson, 1960). Fue en 1964 que Rahman logró simular un sistema molecular con potencial realista usando MD como el comportamiento de fase de las partículas de Lennard-Jones, iniciando así una línea de investigación enfocada en las propiedades del modelo de Lennard-Jones (Rahman, 1964; Verlet, 1968; Verlet, 1967). Se empezaron a estudiar las propiedades del argón líquido y el agua

mediante simulación MD. Después de eso, las moléculas diatómicas fueron modeladas usando dinámica molecular por Harp y Berne (Harp y Berne, 1970).

En las últimas décadas la simulación de MD se ha enfocado en la resolución de problemas relacionados con proteínas, ADN, polímeros, cristal líquido, nanoscina y diversos sistemas de materia condensada. La simulación por computadora también ha avanzado hacia sistemas de no equilibrio, dinámica estocástica e incorporación de efectos cuánticos.

#### **5.4.2 Mecánica molecular**

Las simulaciones de dinámica molecular (MD) generan una información muy detallada del sistema a nivel microscópico, posiciones y momentos para todas las partículas en función del tiempo. Para obtener información útil a nivel macroscópico, es necesario hacer algunos promedios. En dinámica molecular, se evalúan las cantidades promedio realizando un promedio de tiempo, un promedio a lo largo de la trayectoria generada en el espacio de fase. Los principios de la dinámica molecular se basa en los principios de la mecánica clásica y constituye uno de los métodos más usados en la simulación de macromoléculas como proteínas o ADN. Ambas técnicas, no obstante, se pueden combinar en aproximaciones de Mecánica Cuántica / Mecánica Molecular. Con este método híbrido una pequeña parte del sistema implicada, por ejemplo, en una reacción química, se estudia mediante QM mientras que el resto de los átomos se considera mediante MM. Los cálculos de mecánica molecular tienen fundamento teórico en la aproximación de Born-Oppenheimer que permite separar los movimientos del núcleo y de los electrones. Se considera que, debido a que la masa del núcleo es muy superior a la de los electrones, estos pueden adaptarse rápidamente a cualquier cambio en las posiciones de los núcleos. Por lo tanto, la energía de una molécula en su estado basal, puede considerarse como una función de las coordenadas de los núcleos atómicos. Esta función se la denomina Campo de Fuerzas o Force Field. Los cambios que se producen en la energía potencial de un sistema pueden representarse como una superficie, denominada superficie de energía potencial.

Uno de los objetivos en modelado molecular es encontrar los puntos mínimos en la superficie energética que corresponden a estructuras moleculares optimizadas. También es importante encontrar los “puntos de silla” (puntos de pendiente igual a cero en cualquier dirección). Estos puntos se consideran barreras de mínima energía en los caminos que conectan los distintos mínimos y que corresponden a los estados de transición (Cramer, 2004).

### 5.4.3 El campo de fuerzas o force fields

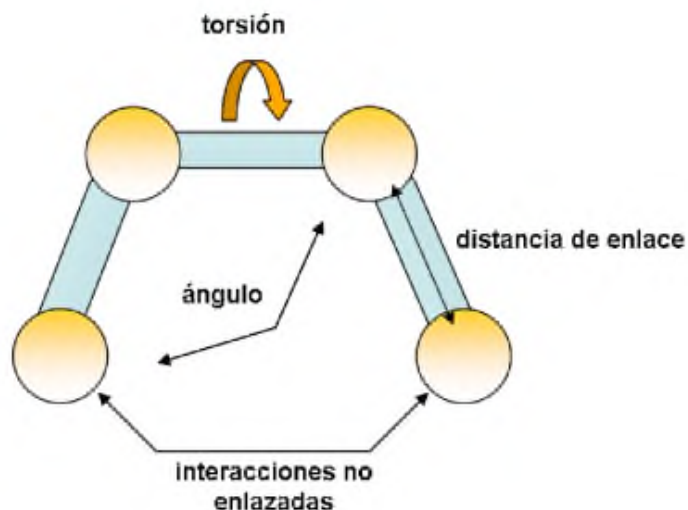
Un campo de fuerza es un método computacional que se utiliza para estimar las fuerzas entre átomos dentro de moléculas y también entre moléculas. Más precisamente, el campo de fuerza se refiere a la forma funcional y de parámetros conjuntos utilizados para calcular la energía potencial de un sistema de átomos o partículas en la mecánica molecular, dinámica molecular, o simulaciones de Monte Carlo.

Los primeros campos de fuerzas para simulaciones biomoleculares fueron desarrollados por primera vez hacia 1970 (Hagler *et al.*, 1974). Desde entonces un gran número de campos de fuerza empíricos para MM han sido desarrollados para la simulación de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras moléculas biológicas. Es importante diferenciar entre los programas empleados en simulación y los parámetros de MM desarrollados para ellos dado que en muchas ocasiones los nombres coinciden. Existe una gran variedad de force fields creados en función de los grupos de moléculas empleados como referencia en la parametrización y a los que va destinado. Desde los aplicados a moléculas orgánicas pequeñas y medianas (MM2, MM3, MM4, TRIPOS, MMFF94, UFF, GAFF) y los dirigidos a macromoléculas (AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS). De acuerdo a la definición un campos de fuerzas se conforma por la función de energía potencial y parámetros empíricos. Una característica importante de un campo de fuerzas es su capacidad de poder ser transferido, es decir, una misma serie de parámetros puede ser empleada para el estudio de distintas moléculas relacionadas entre sí. La mayoría de los campos de fuerzas empleados para sistemas moleculares se pueden definir

mediante una ecuación con dos componentes principales que describen las interacciones enlazantes y no enlazantes del sistema:

$$E_{total} = \underbrace{E_{enlace} + E_{ángulo} + E_{torsional}}_{\text{Enlazante}} + \underbrace{E_{vdw} + E_{elec}}_{\text{No enlazantes}}$$

La forma funcional básica de energía potencial en mecánica molecular incluye términos enlazados para interacciones de átomos que están enlazados por enlaces covalentes, incluyendo ángulos de valencia y ángulos torsionales propios e impropios. Los términos no enlazados (también denominados no covalentes) describen las fuerzas electrostáticas de largo alcance y de van der Waals (Allen, 2004). En la figura 16 se esquematizan ambos tipos de interacciones.

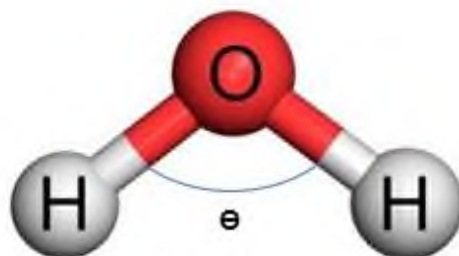


**Figura 16.** Esquema de las interacciones enlazantes y no enlazantes que se tienen en cuenta en un campo de fuerzas de MM

#### 5.4.5 Término de Ángulo de enlace

Los ángulos de enlace dependen de la estructura molecular que a su vez se relaciona con la disposición de los pares de electrones en las moléculas (Solomons

G., 1992). Estos ángulos de enlace no varían mucho del ángulo de equilibrio a temperatura ambiente, con respecto a sus valores de referencia también se representa mediante un potencial armónico de Hooke:



**Figura 17.** Ángulo de enlace del agua que se obtiene de las posiciones de los átomos.

$$E_{\text{ángulo}} = \frac{K_{\theta}}{2}(\theta - \theta_{eq})^2$$

Donde  $\theta$  es el ángulo de enlace que forman los átomos,  $\theta_{eq}$  es el ángulo de equilibrio y  $K_{\theta}$  es la constante de enlace que se obtiene experimentalmente o con metodología de la química cuántica.

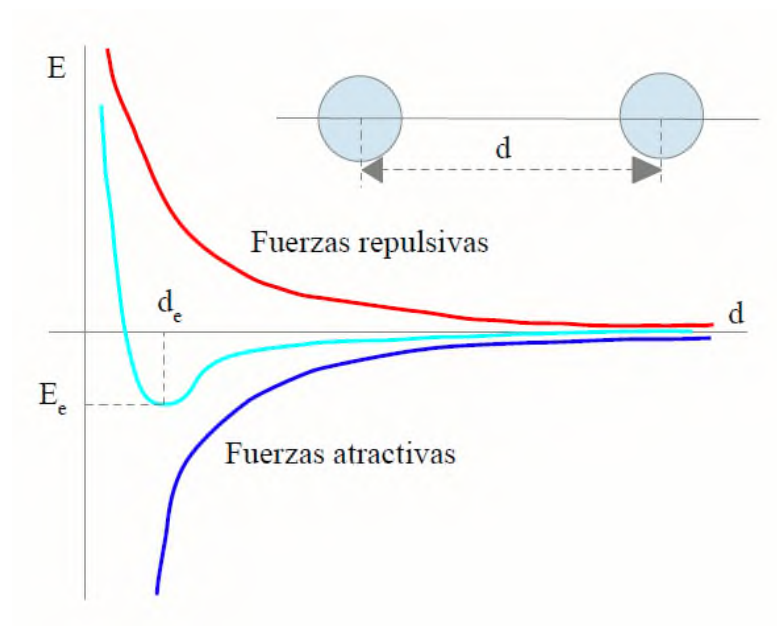
#### 5.4.6 Término de Ángulo de torsión.

El ángulo de torsión describe los cambios de energía alrededor de enlaces sencillos dentro de una serie de cuatro átomos (Solomons G., 1992). Este término presenta periodicidad en el ángulo  $\Phi$  : si el enlace rota  $360^{\circ}$  la energía debe volver al mismo valor. Su perfil energético se expresa como una serie de Fourier :

$$E_{torsional} = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]$$

#### 5.4.7 Interacciones de Van der Waals

Las fuerzas de Van der Waals o interacciones de Van der Waals resultan de un balance entre aquellas fuerzas atractivas y repulsivas existentes entre dos átomos o moléculas. Estas fuerzas son distintas a aquellas debidas a un enlace intermolecular (enlace iónico, enlace metálico y enlace covalente de tipo reticular). Este tipo de energía varía en función de la distancia que separa ambos átomos como se muestra en la figura 18. Donde la energía toma valor de cero a una distancia interatómica infinita e incluso despreciable distancias relativamente muy cortas. La energía disminuye cuando se reduce la distancia hasta llegar a un mínimo. Después al continuar disminuyendo la distancia, la energía crece rápidamente (Chang R. 2003).



**Figura 18.** Potencial de interacciones de Van der Waals

#### **5.4.8 Interacciones electrostáticas**

Las cargas puntuales en una molécula se ordenan representando la distribución de carga. La suma de las interacciones entre pares de cargas puntuales se usa para calcular la interacción electrostática de una molécula de acuerdo a la ley de Coulomb.

#### **5.4.9 Minimización de la energía**

Al momento de realizar un modelado molecular se deben estudiar los puntos mínimos en la superficie de energía potencial relacionados a los estados estables del sistema. Cualquier cambio en esta configuración produciría un incremento de la energía potencial. Cuando en algunos casos hay varios mínimos en la superficie energética, el punto con el mínimo energético más bajo se le conoce como mínimo global mientras que los demás puntos se los denomina mínimos locales (figura 19).

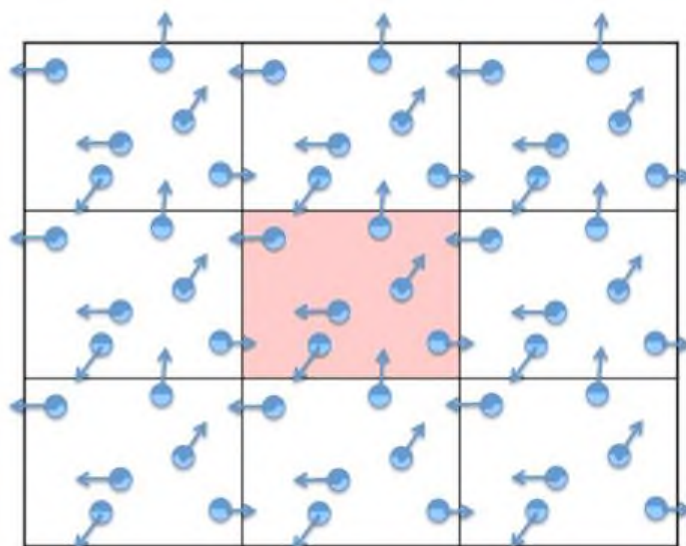
El punto energético más alto en el camino entre dos puntos mínimos se le conoce como punto de silla y corresponde al estado de transición. El proceso que permite identificar las geometrías del sistema que corresponden a los puntos de mínima energía potencial se denomina algoritmo de minimización. Los métodos más empleados para la minimización de energía en modelado molecular son los basados en las derivadas de la función potencial, especialmente el de “descenso más pronunciado” (steepest descent) y el de “gradiente conjugado” (conjugate gradient). Ambos modifican las coordenadas de los átomos mientras desplazan el sistema hacia el del punto de mínima energía (Leach, 2001).



**Figura 19.** Esquema de la superficie energética.

#### 5.4.6 Condiciones de límite periódico

Como se sabe, el agua es importante en todos los organismos vivos. Las simulaciones de DM deben intentar reproducir las interacciones de un disolvente acuoso con el sistema biológico a estudiar. Durante una simulación, el sistema biológico incluido en una caja de agua incluye átomos que se localizan en el borde del área de simulación. Para que las moléculas que las moléculas que se encuentran en los bordes de la caja no se sientan como moléculas superficiales, se replica en todas las direcciones la caja central y el cálculo de la simulación se desarrolla como si el sistema fuera infinito en el espacio (figura 20) (Leach, 2001).



**Figura 20.** Condiciones de límite periódico en dos dimensiones

### 5.4.10 Programas usados en dinámica molecular

Actualmente hay diversos programas para realizar simulaciones de dinámica molecular, En la Tabla 4 se listan algunos de los más usados junto con tutoriales y enlaces a sus páginas web.

Tabla 4: Listado de programas y tutoriales para realizar simulaciones de dinámica molecular.

<i>Programa/Tutorial</i>	<i>URL</i>
<i>AMBER</i>	<a href="http://ambermd.org">http://ambermd.org</a>
<i>Uso de VMD con AMBER</i>	<a href="http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial2">http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial2</a>
<i>Simulación de un fármaco</i>	<a href="http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial4b">http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial4b</a>
<i>Análisis de trayectorias con Ptraj</i>	<a href="http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial5">http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial5</a>
<i>Dinámica Molecular dirigida</i>	<a href="http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial10">http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial10</a>
<i>QM/MM</i>	<a href="http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial2">http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial2</a>
<i>CHARMM</i>	<a href="http://www.charm.org">http://www.charm.org</a>
<i>GROMOS</i>	<a href="http://www.gromos.net">http://www.gromos.net</a>

*NAMD*

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd>

*TINKER*

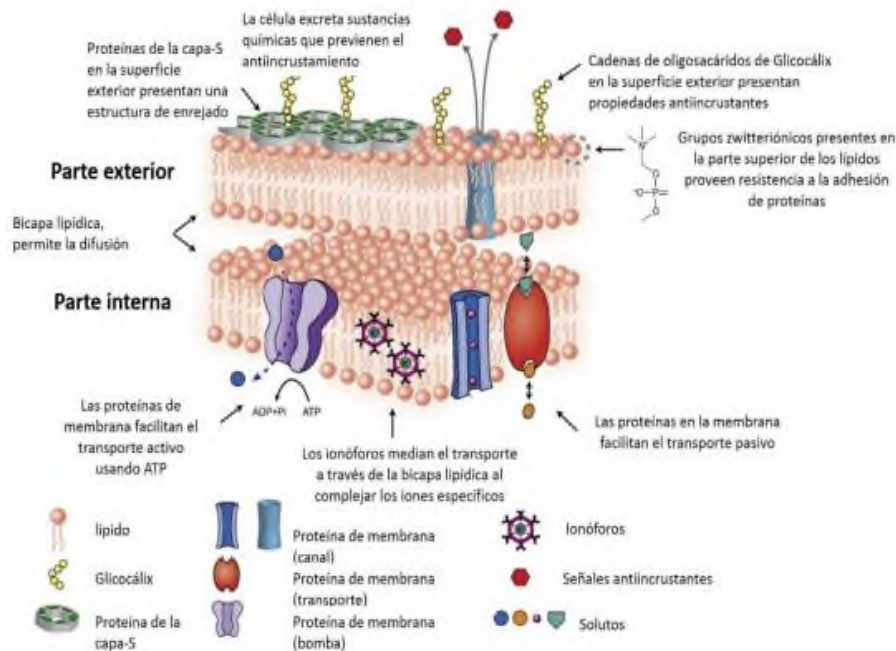
<http://dasher.wustl.edu/ffe>

## 5.5 La membrana lipídica

El complejo fármaco-ciclodextrina debe interactuar con la membrana lipídica para que el fármaco llegue al interior de la célula y poder ejercer su acción al inhibir la interacción  $\beta$ -catenina-TCF/LEF. Algunos programas de la sección anterior servirían para realizar simulaciones de la interacción fármaco-ciclodextrina, ciclodextrina-membrana, fármaco-membrana. Por tanto, las simulaciones que se han llevado a cabo con las membranas lipídicas son importantes. A continuación, se da un repaso de la información que se conoce de estos sistemas y como se han estudiado con uso de la dinámica molecular.

Las células y sus organelos poseen láminas planas conocidas como membranas que forman una barrera selectiva continua alrededor que protegen sus estructuras celulares. Se conoce que estas barreras también proporcionan comunicación y transporte de nutrientes y fluidos. Las membranas celulares son sistemas complejos compuestas de lípidos de diversos tipos, proteínas, carbohidratos, esteroides y muchas otras moléculas se involucran en varios procesos celulares. Las moléculas con mayor relevancia son los lípidos, las proteínas y el agua.

La mayoría de los estudios biofísicos que involucran biomembranas se realizan en modelos con bicapas hidratadas, que comprenden una especie de lípidos o una simple mezcla de ellos. (Pasenkiewicz-Gierula et al., 2016)



**Figura 21.** Complejidad de la membrana celular.

Las membrana celular o bicapa de lípidos (o bicapa de fosfolípidos) es una fina membrana polar formada por dos capas de moléculas de lípidos (Shen et al., 2014) (figura 21). Esta mantiene los iones, las proteínas y otras moléculas donde se requieren. Las bicapas lipídicas cuentan nanómetros de ancho, y son impermeables a la mayoría de las moléculas solubles en agua (hidrófilas).

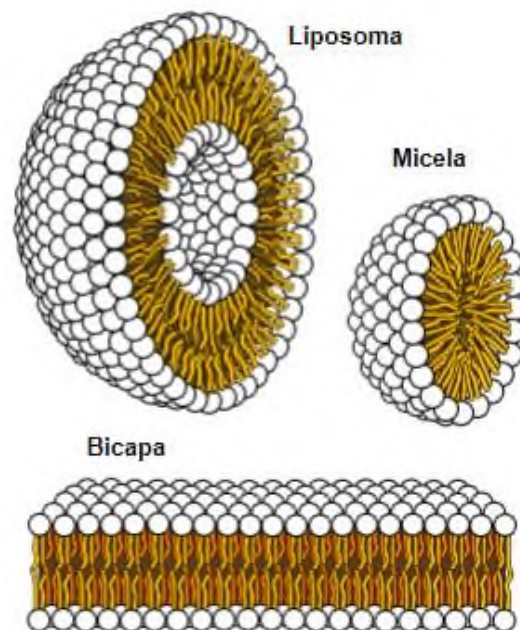
Los lípidos son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como cloroformo, éter o benceno, contienen grupos de hidrocarburos de cadena larga en sus moléculas, y están presentes en organismos vivos o derivados de ellos. Son conformados por una amplia gama de compuestos, ácidos grasos, y derivados tales como glicéridos, ésteres de cera, fosfolípidos, glucolípidos y sulfolípidos. (Rosentrater y Evers, 2018).

Los fosfolípidos son un tipo de lípidos compuestos por una molécula de alcohol (glicerol o de esfingosina), a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. La "cabeza" hidrófila de la molécula contiene el grupo fosfato y

glicerol y la "cola" hidrofóbica generalmente consta de dos cadenas de ácido graso. (Fellows, 2017). Usualmente, los fosfolípidos están compuestos de un esqueleto de glicerol unido a ácidos grasos, ácido fosfórico y un segundo grupo, generalmente colina, etanolamina, serina o inositol y cumplen con un rol importante en las membranas celulares (Sanders, 2016).

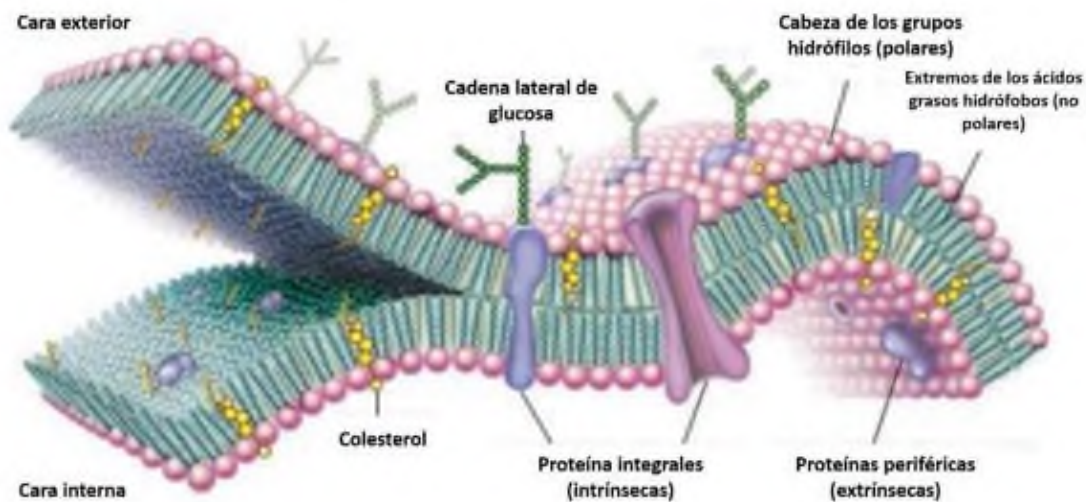
Los principales tipos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilglicerol (PG). (List, 2016).

Por lo general, los fosfolípidos se organizan bicapas o micelas y liposomas (figura 22) debido a la naturaleza anfipática de los lípidos que lo componen ("cola" hidrofoba que tiene una baja afinidad por el agua), y el grupo hidrófilo (que tiene una alta afinidad por el agua) (John Daintith y Martin, 2010). En ausencia de agua, no se puede formar una bicapa y en la mayoría de los casos, la deshidratación completa de una bicapa es muy difícil de lograr, además que conduce a su daño. (Disalvo et al., 2015).



**Figura 22.** Las tres principales estructuras de fosfolípidos formados en solución; el liposoma (una bicapa cerrada), el micelio y la bicapa.

En una bicapa, la parte hidrofóbica (sección hidrocarbonada del ácido graso) se orienta hacia la parte hidrófoba de otro lípido; así las cadenas no polares de los ácidos grasos se mantienen juntas, evitando el contacto con el agua, maximizando las interacciones hidrofóbicas (Singer y Nicolson, 1972), y la parte hidrófila (sección del grupo colina) se orienta hacia la capa acuosa, manteniendo los grupos iónicos y zwitteriónicos en contacto directo con la fase acuosa en las superficies exteriores de la bicapa, maximizando las interacciones hidrófilas (Singer y Nicolson, 1972) (Figura 23) este arreglo constituye el núcleo bicapa no polar. (Chanda, Chakraborty, Bandyopadhyay, 2006; Pasenkiewicz-Gierula et al., 2016).



**Figura 23.** Modelo representativo de la membrana celular.

### 5.5.1 Dinámica molecular y las membranas biológicas

En MD de biomembranas, se emplean 3 variedades principales de modelos moleculares: modelos todo-átomo, de grano grueso (CG, por sus siglas en inglés) y modelos mixtos de átomos / CG. Habitualmente los modelos de todos los átomos son los más precisos, pero computacionalmente los más caros. Para aumentar las escalas de tiempo dentro de las simulaciones, se han desarrollado métodos de grano grueso totalmente diferentes para modificar la ilustración de proteínas, agua y lípidos (Mori et al., 2016).

Los métodos de simulación de grano grueso (CG) se justifican en la idea de disminuir sistemáticamente el grado de detalle en la manera en que se constituye el sistema, aumentando así la escala de tiempo / longitud de la simulación. Una forma de hacer esto es modelando el sistema como un conjunto de partículas efectivas (“cuentas”). Cada una de estas cuentas implica un conjunto de átomos cuyos grados de libertad atómicos no juegan un papel importante en el proceso considerado y están integrados. Con la ayuda de enfoques de tiempo de CG, la simulación puede acceder a dos o tres órdenes de magnitud de escalas más largas y se puede explorar un espacio-tiempo más grande (Ingólfsson et al., 2014).

Uno de los modelos estándar más importantes es el modelo MARTINI desarrollado por Marrink et al. En este modelo, muchos átomos en proteínas y lípidos se aproximan como una partícula segura y 4 moléculas de agua son tratadas como una sola partícula (Marrink et al., 2007).

En contraste del método experimental que ofrece información estructural y dinámica con respecto a las moléculas que se promedian sobre una gran variedad de moléculas, y en intervalos de la ventana de tiempo del método experimental, los métodos computacionales, en particular la dinámica molecular (MD), pueden llegar a obtener una resolución atómica y tiempo de observación (en la duración de  $10^{-6}$  s o más) por paso de diecisiete femtosegundos. Los cálculos del modelo pueden, si se apoya en un modelo a escala atómica correcto con los campos de fuerza necesarios, proporcionar información muy cuidadosa sobre la estructura y dinámica de las bicapas (Mouritsen y Bagatolli, 2016).

### **5.5.2 Estudios de la interacción de la beta-ciclodextrina y membranas biológicas con enfoque de dinámica molecular.**

Hasta el momento no hay estudios reportados con el compuesto o-hidroxicinamaldehído y su interacción con las ciclodextrinas, ni mucho menos como la interacción de estos con las membranas lipídicas desde el enfoque de la dinámica molecular. Sin embargo, estos estudios si se han realizado con otros fármacos, habiendo dos estudios de este tipo hasta el momento de redactar esta revisión.

Los compuestos con propiedades farmacológicas se relacionan con las membranas. Esta interacción de un fármaco con membranas ó bicapas lipídicas se reconocen su capacidad para realizar objetivos en los seres vivos a nivel intracelular. Por lo tanto, investigaciones enfocadas en las interacciones fármaco-membrana son de gran interés para el diseño de fármacos. Recientemente, se ha reconocido que algunos fármacos interaccionan con la membrana de la bicapa lipídica, ya sea al alterar la integridad de la membrana, aumentando la permeabilidad de la bicapa, con la unión a objetivos de macromoléculas transmembrana disolviéndose dentro de la membrana, o fijando la conformación de la proteína de membrana alterando las propiedades de la bicapa lipídica (MacCallum y Tieleman, 2008).

Dentro de las técnicas existentes para estudiar las interacciones entre moléculas pequeñas y membranas, las simulaciones de dinámica molecular (MD) son ampliamente utilizadas para estudiar los sistemas fármaco-membrana: en la obtención de información acerca de la interacción a escala molecular y la predicción de propiedades termodinámicas. Las simulaciones de MD son generalmente convenientes para estudiar estos sistemas debido a las cualidades del método para cuantificar interacciones no covalentes de la magnitud de la energía térmica, que a menudo establecen la evolución y el ajuste de sistemas blandos como las bicapas lipídicas (Kopeć, Telenius y Khandelia, 2013).

Como se ha reportado en la literatura y en este trabajo, algunos compuestos presentan actividad farmacológica para objetivos específicos y propiedades tóxicas e irritabilidad cuando no se encuentran en los lugares correctos de actividad terapéutica.

Diversos métodos y sistemas de administración de fármacos se han desarrollado continuamente con el objetivo de mejorar la eficacia de los fármacos y, en consecuencia, reducir la toxicidad mediante el transporte directo a objetivos específicos. Es en este contexto dónde las ciclodextrinas se presentan como posibles portadores de fármacos.

Según la clasificación de fármacos biofarmacéuticos, dos factores principales miden la capacidad de transporte de los fármacos, la solubilidad y la permeabilidad del fármaco a través de las membranas biológicas (Amidon, 1995). Diversos estudios realizados por métodos experimentales y teóricos han demostrado que el aumento de la solubilidad acuosa de fármacos lipofílicos con la inclusión de ciclodextrinas conduce a una mayor eficacia del fármaco. La administración de fármacos usando beta-ciclodextrinas puede suceder por dos mecanismos principales: 1) el fármaco se disocia de las beta-ciclodextrinas y posteriormente se adsorben en la superficie de la membrana y 2) el complejo fármaco-beta-ciclodextrina se transfiere directamente a la membrana en la que la asociación y permeabilidad del complejos posiblemente están controlados por la barrera de la capa de agua sin movimiento (UWL, por sus siglas en inglés) en la superficie de la membrana . Los complejos fármaco-BCD penetran a través del UWL para alcanzar la superficie de la membrana a través de la difusión pasiva, pero es posible que no lleguen al interior de la membrana debido a su tamaño y otras propiedades fisicoquímicas. En realidad, la unión de BCD en la interfase agua-lípido ha sido probada experimentalmente mediante la extracción de colesterol por beta-ciclodextrina. Hasta el momento, no hay un trabajo que detalle la administración de fármacos en las membranas con la interacción de la capa sin agitar y la membrana en la asociación del complejo fármaco-beta-ciclodextrina (Tommasini et al., 2004; Zhang et al., 2013).

Así, en los últimos años, la comprensión de sistemas biológicos como las membranas se ha logrado mediante la aplicación de la dinámica molecular. En este contexto, se han logrado: 1) simulaciones en fase lipídica que han permitido explicar como pequeñas moléculas interaccionan con las membranas lipídicas, 2) la translocación de la ribosa y sus dos diastereómeros en 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) y 3) estudiar las propiedades fisicoquímicas, interacción del huésped y autoagregación de moléculas de glucosa como ciclodextrinas tanto en fase gaseosa como en fase de solución (Wei,2009).

Se puede comprender los sistemas de administración de fármacos que se basan en la aplicación de ciclodextrinas como carga de fármaco mediante la evaluación de la afinidad de unión del fármaco a la ciclodextrina y la complejidad misma. La liberación de fármacos se ha descrito en estudios en términos de la interacción del fármaco, ciclodextrinas y el complejo fármaco-ciclodextrinas con membranas lipídicas (MacCallum y Tieleman 2008; Khuntawee et al., 2015).

En trabajos recientes se han realizado simulaciones para estudiar el comportamiento de las ciclodextrinas con la bicapa lipídica (Khuntawee et al., 2015). Se han realizado configuraciones de beta-ciclodextrinas con distintas orientaciones a una distancia de 3.5 nm en la dirección z del centro de la bicapa. Todas las simulaciones se realizaron utilizando GROMACS y la membrana POPC fue simulada con el mismo programa (Berger et al., 2015). Los parámetros modificados y la molécula de beta-ciclodextrina se puede describir mediante GROMOS. Así, las visualizaciones moleculares se pueden realizar utilizando el software Visual Molecular Dynamics (VMD) (Khuntawee et al., 2015). Este grupo de trabajo encontró que basados en las simulaciones de MD de la molécula de  $\beta$ -ciclodextrina con bicapa lipídica en la escala de tiempo de microsegundos, la molécula  $\beta$ -ciclodextrina penetraba espontáneamente hacia la superficie lipídica, pero no avanzaba más hacia la región de la cola bicapa de acuerdo con los cálculos de energía libre. Observaron una distorsión de la bicapa cuando la molécula de  $\beta$ -ciclodextrina se adhirió a la superficie de la bicapa. Por el contrario, la formación de poros de agua en la bicapa lipídica posiblemente ocurría cuando la molécula de  $\beta$ -ciclodextrina permanecía dentro de la bicapa. Los resultados de la simulación también mostraron que el borde secundario de la molécula de  $\beta$ -ciclodextrina contribuyó principalmente a las interacciones  $\beta$ -ciclodextrina-lípido en las que siempre se encontraron 5-7 enlaces de hidrógeno entre el borde secundario y las cabezas lipídicas durante todo el tiempo de simulación. Curiosamente, las conformaciones de la molécula  $\beta$ -ciclodextrina cambiaban en varias fases de solvatación (agua, interfase agua-bicapa y bicapa) debido a la pérdida de los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Observaron la interfase agua-bicapa. Estos hallazgos podrían estar relacionados con el mecanismo de liberación del fármaco;

sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer para comprender la función del  $\beta$ -ciclodextrina como posible portador del fármaco (Khuntawee et al., 2015).

Se ha estudiado la  $\alpha$ -mangostina, un fármaco con actividad similar al o-hidroxicinamaldehído. La  $\alpha$ -mangostina (MGS) exhibe diversas actividades farmacológicas, que incluyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacterianas y antiinflamatorias. Sin embargo, su baja solubilidad en agua es el principal obstáculo para su uso en aplicaciones farmacéuticas (Hotarat et al., 2020). Para aumentar la solubilidad en agua de MGS, la formación de complejos con beta-ciclodextrinas ( $\beta$ CD), particularmente con la  $\beta$ CD nativa y su derivado 2,6-dimetil- $\beta$ -CD (DM $\beta$ CD) fue una técnica prometedora. Aunque ha habido varios informes sobre la adsorción de  $\beta$ CD en la bicapa lipídica, la liberación del complejo de inclusión MGS/ $\beta$ CD a través de la membrana biológica sigue sin estar clara. En el estudio (Hotarat et al., 2020) se investigó la liberación de MGS de las dos  $\beta$ CD diferentes ( $\beta$ CD y DM $\beta$ CD) a través de la bicapa lipídica. En primer lugar, la adsorción de MGS libre,  $\beta$ CD libres, y la formación de complejos de inclusión se estudió mediante simulación de dinámica molecular convencional. El MGS en complejo con esos dos  $\beta$ CD fue capaz de liberar espontáneamente MGS libre en la membrana interna. Sin embargo, tanto las moléculas de MGS como las de DM $\beta$ CD penetraron potencialmente en la región más profunda de la membrana interior, mientras que la  $\beta$ CD solo se adsorbió en la superficie de la membrana externa. La interacción entre el borde secundario de  $\beta$ CD y los grupos fosfato de 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfolina (POPC) de la membrana mostró el mayor número de enlaces de hidrógeno (hasta 14) correspondientes a la ubicación favorable de  $\beta$ CD en la membrana de POPC. Además, los hallazgos sugirieron que la energía electrostática era la principal fuerza impulsora de la adsorción de  $\beta$ CD en la membrana POPC, mientras que las interacciones de van der Waals desempeñaban un papel predominante en la adsorción de DM $\beta$ CD.

## 6. CONCLUSIONES

Se logró realizar una revisión bibliográfica acerca de las ciclodextrinas y la posible encapsulación del fármaco o-hidroxicinamaldehído como solución al cáncer de

colon en la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Se investigaron los efectos del o-hidroxicinamaldehído sobre la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y se revisaron estudios de CDs y fármacos con simulación molecular.

Se sabe que siendo la vía de señalización Wnt/beta-catenina una causa principal del cáncer de colon, se han propuesto fármacos para esta vía, dentro de los cuales, el o-hidroxicinamaldehído es un compuesto del cual se han reportado actividades biológicas antiangiogénicas, antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarias y antiproliferativas de células del cáncer de colon. Este fármaco inhibe la interacción de la  $\beta$ -catenina con TCF/LEF dentro de la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -catenina, por tanto, el blanco molecular de nuestro fármaco de estudio es la  $\beta$ -catenina. Sin embargo, se sabe que este compuesto es tóxico e irritable durante su consumo, presentando una extrema toxicidad con un DL50 de 750 mg/kg que es comparable al del arsénico metálico (DL50 de 763 mg/kg), por estas razones desde el año 2013 no hay más estudios sobre este fármaco, puesto que su baja solubilidad dificultaba aún más su aplicación.

En esta tesis, una de las razones por la cual se escogió este fármaco de entre todos, es que no hay muchos estudios sobre él, se mantuvo olvidado mucho tiempo y la propuesta para su aplicación es transportarla de manera segura al citoplasma de las células donde ejerce su acción terapéutica.

En el contexto de la dinámica molecular, simular interacciones de esta molécula con las ciclodextrinas resulta interesante teniendo en cuenta que la estructura en forma de cono truncado de las ciclodextrinas ofrece el potencial de encapsular pequeñas moléculas hidrófobas y, en consecuencia, mejorar su estabilidad y actividad biológica, el desarrollo del encapsulamiento de o-hidroxicinamaldehído en ciclodextrinas resulta ser una técnica poderosa y viable para liberación del fármaco a su destino de manera adecuada y segura para el organismo, es decir, controlando la liberación del fármaco a través de la membrana biológica.

Las ciclodextrinas naturales incluyen  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD que constan de seis, siete y ocho subunidades de glucosa, respectivamente, mediante las cuales pueden

mejorar eficazmente la solubilidad de compuestos poco solubles. Entre estas ciclodextrinas nativas, la  $\beta$ -CD es la CD más comúnmente utilizada en aplicaciones farmacéuticas e industriales debido a su tamaño de cavidad adecuado para encapsular varias moléculas hidrófobas y mejorar su solubilidad.

Para mejorar las propiedades de la beta-ciclodextrina, se ha demostrado en la literatura que sustituyentes en algunos de los grupos hidroxilo presentes en la molécula de  $\beta$ -CD mejoran la solubilidad en agua de algunos fármacos, por tanto, realizar derivados de beta-ciclodextrinas para encapsular el o-hidroxicinamaldehído es una poderosa opción a tomar en cuenta.

Generalmente, las regiones hidrófilas externas o los grupos funcionales polares en las moléculas de las ciclodextrinas mejoran la adsorción del fármaco/molécula encapsulada en los grupos de cabeza polar de la membrana lipídica antes de entregar la molécula a través de la membrana. Estudios han demostrado que las ciclodextrinas promueven el transporte del fármaco a través de la capa de la membrana a través de la difusión pasiva.

Actualmente, hay varios métodos y modelos disponibles para predecir la permeabilidad del fármaco a través de una membrana biológica. La simulación de dinámica molecular juega un papel importante en la determinación del comportamiento dinámico y el proceso de liberación de los complejos fármaco-ciclodextrinas a nivel atómico.

Por último, de acuerdo a la literatura se estima que el comportamiento de liberación del o-hidroxicinamaldehído de la cavidad hidrofóbica de la beta-ciclodextrina se puede observar mediante dos enfoques: Aplicando simulaciones de MD para investigar la adsorción del fármaco libre en la superficie lipídica en comparación con el fármaco complejado con beta-ciclodextrina, considerando las diferentes conformaciones iniciales del compuesto dentro de la cavidad de la  $\beta$ -CD.

Simulaciones de MD por triplicado durante un período determinado mostrarían que tan probable es que el fármaco se libere espontáneamente de la cavidad de la  $\beta$ -

CD. Además, los perfiles de energía libre para la liberación de los complejos de inclusión fármaco/ $\beta$ -CD a través de la membrana lipídica indican los mínimos de energía durante el proceso de translocación del fármaco.

## 7. REFERENCIAS

- Akiyama T. 2000. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*;11(4):273-82
- Alder B.J. y Wainwright T.E. 1957. *J. Chem. Phys.* 27, 1208 (1957).
- Allen. Michael P. 2004. *Introduction to Molecular Dynamics Simulation*. Vol. 23, ISBN 3-00-012641-4, pp. 1-28
- Amidon, G.L.; Lennernas, H.; Shah, V.P.; Crison, J.R. 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413-420.
- Amit, S., A. Hatzubai, et al. 2002. "Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway." *Genes Dev* 16(9): 1066-1076.
- Barker, N.; Clevers, H. 2006. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 997–1014.
- Behrens, J., et al. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 382(6592): p. 638-42.
- Beroud C, Soussi T. 1996. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*; 24: 121-4.
- Bhanot, P., et al. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382(6588): p. 225-30.
- Bienz M., Clevers H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell.*103(2):311-20. Review
- Bodine, P.V., et al. 2009. A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. *Bone.* 44(6): p. 1063-8.

- Brabletz T., Jung A., Dag S., Hlubek F. & Kirchner T. 1999. Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155 1033-1038.
- Bryja, V., G. Schulte, et al. 2007. "Wnt-3a utilizes a novel low dose and rapid pathway that does not require casein kinase 1-mediated phosphorylation of Dvl to activate beta-catenin." *Cell Signal* 19(3): 610-616.
- Buechling T., Boutros M. 2011. Wnt signaling signaling at and above the receptor level. *Curr Top Dev Biol* 97:21-53.
- Burt RW. 2000. Colon Cancer Screening. *Gastroenterology*; 119: 837-53.
- Buschmann HJ, Schollmeyer E. 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J. Cosmet. Sci.*, 53, 185.
- Cadigan, K. M.; Peifer, M. Cold Spring Harb. 2009. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Perspect. Biol.*, 1 a002881.
- Caesar, G. V. 1968. Dextrins and dextrinisations. In: Radley, J.A. Ed., starch and its derivatives, 4th edn., Chapman & Hall, London. 282–289.
- Camilli T.C, Weeraratna A.T. 2010. Striking the target in Wnt-y conditions: intervening in Wnt signaling during cancer progression. *Biochem Pharmacol*; 80(5):702-11.
- Cerón-Carrasco, J.P., den-Haan, H., Peña-García, J., Contreras-García, J., Pérez-Sánchez, H. 2016. Exploiting the cyclodextrins ability for antioxidants encapsulation: a computational approach to carnosol and carnosic acid embedding. *Comput. Theor. Chem.* 1077, 65–73.
- Chanda J., Chakraborty S., Bandyopadhyay, S. 2006. Sensitivity of Hydrogen Bond Lifetime Dynamics to the Presence of Ethanol at the Interface of a Phospholipid Bilayer.
- Chang R. 2003. "Química", 7ª. Edición, Ed. McGraw-Hill, México,
- Chen, B., et al., Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*, 2009. 5(2): p. 100-7.

- Chien, A. J.; Conrad, W. H.; Moon, R. T. 2009. A Wnt survival guide: from flies to human disease *J. Invest. Dermatol.* 129, 1614–1627.
- Choi, J.; Lee, K. T.; Ka, H.; Jung, W. T.; Jung, H. J.; Park, H. J. 2001. Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. *Arch. Pharm. Res.* 24, 418–423.
- Clark C.E., Nourse C.C, Cooper H.M. 2012. The tangled web of noncanonical wnt signalling in neural migration. *Neurosignals* 20:202-220.
- Clevers, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 127, 469–480.
- Clevers, H. and R. Nusse. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6): p. 1192-205.
- Cong, F. and H. Varmus. 2004. "Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta- catenin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2882 -2887.
- Cowin P., Rowlands T.M., Hatsell S.J. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 17(5):499-508.
- Cramer, C. J. 2004. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models.* Wiley, 2 edition.
- Daintith J., y Martin E. 2010. Labelling to lysozyme. In J. Daintith & E. Martin (Eds.), *Dictionary of Science (Sixth, pp. 456–492).* New York, USA: Oxford University Press, Inc.
- DeVita, V. T. Jr and Rosenberg, S. A. 2012. Two hundred years of cancer research. *N Engl J Med.* 366, 2207-2214.
- Disalvo, E.A., Pinto O.A., Martini M.F., Bouchet A.M., Hollmann A., Frías, M.A. 2015. Functional role of water in membranes updated: A tribute to Träuble. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(7), 1552–1562.
- Dowlatshahi, D., G. M. MacQueen, et al. 1999. "G Protein-coupled cyclic AMP signaling in postmortem brain of subjects with mood disorders: effects of

diagnosis, suicide, and treatment at the time of death." J Neurochem 73(3): 1121-1126.

- Eastburn, S. D., Tao, B. Y. 1994. Applications of modified cyclodextrins. Biotechnol. AAdv. 12, 325-339.
- Emami, K.H., et al. 2004, A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(34): p. 12682-7.
- Fagotto, F., E. Jho, et al. 1999. "Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization." J Cell Biol 145(4): 741-756.
- Favre, L. C., dos Santos, C., López-Fernández, M. P., Mazzobre, M. F., & Buera, M. del P. 2018. Optimization of  $\beta$ -cyclodextrin-based extraction of antioxidant and anti-browning activities from thyme leaves by response surface methodology. Food Chemistry, 265, 86–95.
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. 2001. The ABC of APC. Hum Mol Genet; 10: 721-33.
- Fearnhead, N. S., M. P. Britton, et al. 2001. "The ABC of APC." Hum Mol Genet 10(7): 721 -733.
- Fellows P.J. 2017. 1.2.1.1. Phospholipids. In P. J. Fellows (Ed.), Food Processing Technology. Principles and practice (Fourth, p. 16). Duxford UK: Elsevier Ltd.
- Fermi E., Pasta J., Ulam S. 1955. Document LA-1940.
- French, D. 1957. The Schardinger dextrans. Adv. Carbohydr. Chem. 12, 189-260.
- Fu Y., Zheng S., An N., Athanasopoulos T., Popplewell L., Liang A., et al. 2011. Beta-catenin as a potential key target for tumor suppression. Int J Cancer.;129(7):1541-51.
- Gago, F. 2009. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Geyer N., Gerling M. 2021. Hedgehog Signaling in Colorectal Cancer: All in the Stroma? Int J Mol Sci. Jan 20;22(3)

- Gibson J.B., Goland A.N., Milgram M. y Vineyard G.H. 1960. *Physical Review* 120, 1229.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. Jun 5;1653(1):1-24.
- Gonzalez-Molina, J., Gramolelli, S., Liao, Z., Carlson, J. W., Ojala, P. M., & Lehti, K. 2019. MMP14 in Sarcoma: A Regulator of Tumor Microenvironment Communication in Connective Tissues. *Cells*, 8(9), 991.
- Hagler, A. T., Huler, E. and S. Lifson. 1974. Energy functions for peptides and proteins. i. derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals. *Journal of the American Chemical*.
- Hajdu, S. I. 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*. 117, 1097-1102.
- Harp GD y Berne BJ. 1970. *Physical Review A* 2, 975.
- He X., Saint-Jeannet J.P., Wang Y., Nathans J., Dawid I., Varmus H. 1997. A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* 275:1652-1654.
- Hermann H. 2013. *Manual de práctica farmacéutica de Hager: para farmacéuticos, fabricantes de medicamentos, farmacéuticos, médicos y funcionarios médicos*. Primer volumen. Springer-Verlag, pág. 1575
- Hino, S., T. Michiue, et al. 2003. "Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin." *J Biol Chem* 278(16): 14066-14073.
- Hirose, T., Yamamoto, Y. 2001. Hinokitiol containing cyclo-olefin polymer compositions and their molding with excellent antimicrobial and gas barrier properties. Japanese Patent JP 55480.
- Hotarat, W., Nutho, B., Wolschann, P., Rungrotmongkol, T., & Hannongbua, S. 2020. *Delivery of Alpha-Mangostin Using Cyclodextrins through a Biological Membrane: Molecular Dynamics Simulation*. *Molecules*, 25(11), 2532.

- Hsu, W., L. Zeng, et al. 1999. "Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain." *J Biol Chem* 274(6): 3439-3445.
- Huber A.H., Nelson W.J., Weis W.I. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*. 90(5):871-82.
- Huber, A.H., W.J. Nelson, and W.I. Weis, 19997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*, 90(5): p. 871-82.
- Huelsken J, Birchmeier W. 2001. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* ; 11: 547-53.
- Ikeda, S., M. Kishida, et al. 2000. "GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin." *Oncogene* 19(4): 537-545.
- Ingólfsson H.I., Lopez C.A., Uusitalo, J.J., de Jong D.H., Gopal S.M., Periole X., Marrink S.J. 2014. The power of coarse graining in biomolecular simulations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 4(3), 225–248.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Copyright, (2020). Disponible en <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=4032>.
- Iwatsuki M, Mimori K, Ishii H, Yokobori T, Takatsuno Y, Sato T, Toh H, Onoyama I, Nakayama Ki, Baba H, Mori M. 2009. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: Clinica significance. *Int J Cancer*.
- Jensen. F. 2006. *Introduction to Computational Chemistry*. Wiley, 2 editions.
- Juanes, M. A. (2020). Cytoskeletal Control and Wnt Signaling—APC's Dual Contributions in Stem Cell Division and Colorectal Cancer. *Cancers*, 12(12), 3811. Identification of c-MYC
- Jung, J. E., Lee, J. Y., Kim, I. R., Park, S. M., Kang, J. W., Kim, Y. H., ... Lee, J. H. (2020). MicroRNA-31 Regulates Expression of Wntless in Both *Drosophila melanogaster* and Human Oral Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7232.

- Katanaev V.L. 1991. The Wnt/Frizzled GPCR signaling pathway. *Biochemistry(Mosc)*. 75(12):1428-34.
- Kawahara, K., T. Morishita, et al. 2000. "Down-regulation of beta-catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with Axin and beta-catenin." *J Biol Chem* 275(12): 8369 -8374.
- Kestler H.A., Kuhl M. 2008. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:1333-1347.
- Khan A, Safdar M, Ali Khan MM, Khattak KN, Anderson RA. 2003. *La canela mejora la glucosa y los lípidos de las personas con diabetes tipo 2*. En: *Diabetes Care* , Volumen 26, 12, págs. 3215-3218
- Khuntawee, W., Wolschann, P., Rungrotmongkol, T., Wong-ekkabut, J., & Hannongbua, S. 2015. *Molecular Dynamics Simulations of the Interaction of Beta Cyclodextrin with a Lipid Bilayer*. *Journal of Chemical Information and Modeling*
- Kinzler K.W., Vogelstein B. 1997. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 7(2):159-70
- Kinzler, K.W., et al. 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 253(5020): p. 661-5.
- Klaus, A.; Birchmeier, W. 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 8, 387–398.
- Koh WS, Yoon SY, Kwon BM, Jeong TC, Nam KS, Han MY. 1998. Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulates T cell differentiation. *Int J Immunopharmacol*. 20:643–60.
- Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara Si, Miyakura Y, Nagai H, Mano H. 2006. Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Oncogene*.25(1):139-46
- Kopeć, W., Telenius, J., & Khandelia, H. 2013. Molecular dynamics simulations of the interactions of medicinal plant extracts and drugs with lipid bilayer membranes. *FEBS Journal*, 280(12), 2785–2805.

- Korinek V., Barker N., Morin P.J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Clevers H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC7- colon carcinoma. *Science*. 275(5307):1784-7
- Laifenfeld, D., R. Karry, et al. 2005. "Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM -L1, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity." *Neurobiol Dis* 20(2): 432-441.
- Leach A. 2001. *Molecular Modelling: Principles and Applications* (2nd Edition). Prentice Hall, 2 editions.
- Lee, H.S., 2002. Inhibitory activity of Cinnamomum cassia bark derived component against rat lens aldose reductase. *J. Pharm. Sci.* 5, 226–230.
- Lee, M. A., Park, H. J., Chung, H.-J., Kim, W. K., & Lee, S. K. 2013. Antitumor Activity of 2-Hydroxycinnamaldehyde for Human Colon Cancer Cells through Suppression of  $\beta$ -Catenin Signaling. *Journal of Natural Products*, 76(7), 1278–1284.
- Lepourcelet, M., et al. 2004. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta- catenin protein complex. *Cancer Cell*. 5(1): p. 91-102.
- Li F., Chong Z.Z., Maiese K. 2005. Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res* 2:331-340.
- Li, L., H. Yuan, et al. 1999. "Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt -mediated regulation of LEF-1." *EMBO J* 18(15): 4233-4240.
- Liao G., Tao Q., Kofron M., Chen J.S., Schloemer A., Davis R.J., Hsieh J.C., Wylie C., Heasman J., Kuan C.Y. 2006. Jun NH2-terminal kinase (JNK) prevents nuclear beta-catenin accumulation and regulates axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16313-16318.
- List G.R. 2016. *Processing and Food Uses of Peanut Oil and Protein*. *Peanuts: 83 Genetics, Processing, and Utilization*, 405–428.
- Liu, J., et al. 2013. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(50): p. 20224-9.

- López J., Perchade M., Coley H. M., Webb A., Crook T. 2009. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br. Cancer.* 100:571-577.
- Lovig T, Meling G, Diep CB, Thorstensen L, Norheim Andersen S, Lothe RA, Rognum TO. 2002. APC and CTNNB1 mutations in a large series of sporadic colorectal carcinomas stratified by the microsatellite instability status. *Scandi Gastroenterol.*37(10):1184-93.
- Lustig, B., B. Jerchow, et al. 2002. "Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors." *Mol Cell Biol* 22(4): 1184-1193.
- Lynch HT, Lynch JF. 1998. Genetics of colorectal cancer. *Digestion*; 59: 481-92.
- MacCallum J.L & Tieleman D.P. 2008. Interactions between small molecules and lipid bilayers. *Curr Top Membr* **60**, 227–256.
- MacDonald, B. T.; Tamai, K.; He, X. 2009. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev.*, 17, 9–26.
- Malki A., ElRuz R.A., Gupta I., Allouch A., Vranic S., Al Moustafa A.E. 2020. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 24;22(1):130.
- Mantilla, C., Suarez M., Duque J. A., and Navas, M.C. 2015.  $\beta$ -catenin signaling mechanisms and its role in carcinogenesis. Vol.29, n.1, pp.109-127
- Manoukian, A.S., et al., The porcupine gene is required for wingless autoregulation in *Drosophila*. *Development*, 1995. 121(12): p. 4037-44.
- Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, A. H. 2007. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(27), 7812–7824.
- McMahon, A.P. and R.T. Moon, 1989. Ectopic expression of the proto-oncogene int- 1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell*.
- Merrill B.J., Gat U., DasGupta R. & Fuchs E. 2001. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev* 15 1688-1705.

- Michaelidis T.M., Lie D.C. 2008 Wnt signaling and neural stem cells: caught in the Wnt web. *Cell Tissue Res* 331:193-210.
- Mikels A.J., Nusse R. 2006. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4:e115.
- Miller J. 2001. The Wnts. *Genome Biology*;3:3001.1-3001.15.
- Mlodzik M. 2002. Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* 2002;18:564-571.
- Molenaar, M., et al. 1996. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86(3): p. 391-9.
- Mori T., Miyashita N., Im, W., Feig M. y Sugita Y. 2016. Molecular dynamics simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(7), 1635–1651.
- N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, and E.Teller, 1953. *Journal of Chemical Physics* 21, 1087
- National Cancer Institute. Cancer genetics Overview. Available at: <http://www.cancer.gov/cancerinfo/pdq/genetics/overview.html>
- Nishisho, I., et al. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 253(5020): p. 665-9.
- Nishisho, Nakamura Y., Miyoshi Y., Miki Y., Ando H., Horii A., Koyama K., Utsunomiya), Baba S., Hedge P. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. Aug 9;253(5020):665-9
- Nishita M., Enomoto M., Yamagata K. & Minami Y. 2010. Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol* 20 346-354
- Noordermeer, J., et al. 1994. Dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature*,. 367(6458): p. 80-3.
- Nusse R., Brown A., Papkoff J., Scambler P., Shackleford G., McMahon A., Moon R., Varmus H. 1991. New nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 64(2):231

- Olszewski, M. M. 2010. Concepts of Cancer from Antiquity to the Nineteenth Century. UTMJ. 87, 181-186.
- Organización Mundial de la Salud. Copyright 2020. Disponible en <https://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Baczynski, K., Markiewicz, M., y Murzyn, K. 2016. Computer modelling studies of the bilayer/water interface. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(10), 2305–2321.
- Piedra J., Martinez D., Castano J., Miravet S., Dunach M., de Herreros A.G. 2001. Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.*;276(23):20436-43.
- Potter, JD. 1999. Colorectal cancer: Molecules and population. *J Nat Cancer Inst*; 91: 916-32.
- Proffitt, K.D., et al. 2013. Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Res.* 73(2): p. 502-7.
- Rahman A y Stillinger FH. 1971. *J. Chem. Phys.* 55, 3336.
- Rahman A. 1964. *Physical Review a-General Physics* 136 (2A), A405.
- Rosentrater KA. Y Evers, AD. 2018. Chemical components and nutrition. In K. A. Rosentrater & A. D. Evers (Eds.), *Kent's Technology of cereals an introduction for students of food science and agriculture* (Fifth, pp. 267–368). Duxford UK: Elsevier Ltd.
- Rubinfeld, B., D. A. Tice, et al. 2001. "Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1epsilon." *J Biol Chem* 276(42): 39037-39045.
- Sakanaka, C., J. B. Weiss, et al. (1998). "Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3020-3023.
- Sanders T.A.B. 2016. Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties. Functional and Nutraceutical Properties. In T. A. B. Sanders (Ed.), *Functional Dietary Lipids: Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health* (First, pp. 69–101). Cambridge, UK: Elsevier Ltd.

- Schlick, T. 2013. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. Springer, New York.
- Schlick, T. 2013. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. Springer, New York.
- Schoumacher, M., et al. 2014. Inhibiting Tankyrases sensitizes KRAS-mutant cancer cells to MEK inhibitors via FGFR2 feedback signaling. *Cancer Res* .74(12): p. 3294-305.
- Shen Y., Saboe, P.O., Sines, I.T., Erbakan, M., Kumar M. 2014. Biomimetic membranes: A review. *Journal of Membrane Science*, 454, 359–381.
- Singer S.J., Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720–731.
- Solomons G. 1992. *Química orgánica* (Editorial Limusa, S.A. de C.V., México D.F., septima reimpression ed.
- Su LK, Jonson KA, Smith KJ, Hill DE, Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. Association between wild-type and mutant APC gene products. *Cancer Res*; 53: 2728-31.
- Su, L.K., B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 262(5140): p. 1734-7.
- Suárez, D., Díaz, N. 2017. Conformational and entropy analyses of extended molecular dynamics simulations of  $\alpha$ -,  $\beta$ -and  $\gamma$ -cyclodextrins and of the  $\beta$ -cyclodextrin/nabumetone complex. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19(2), 1431–1440.
- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. 2006. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet.* 36(4):417-22.
- Szejtli J. 2004. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem.* 76(10):1825-45.

- Szejtli, J. 1982. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. Akadémiai Kiadó, Budapest. 213-214.
- Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Nosho K, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y. 2005. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*. 24(53):7946-52.
- Tetsu O. & McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398 422-426.
- Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M.L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P. 2004. Improvement in Solubility and Dissolution Rate of Flavonoids by Complexation with beta Cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 379-387.
- Varsha J. 2012. *Una revisión sobre las actividades farmacológicas de Cinnamomum cassia Blume.* , En: *International Journal of Green Pharmacy* , Volumen 6, Número 2, págs. 102-108
- Verlet L. 1967. *Physical Review* 159, 98.
- Verlet L. 1968. *Physical Review* 165, 201.
- Villiers A. 1891. Sur la fermentation de la féculé par l'áction du ferment butyrique. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 112, 536-538.
- Wada H. & Okamoto H. 2009. Roles of planar cell polarity pathway genes for neural migration and differentiation. *Dev Growth Differ* 51 233-240.
- Walter RH. 2000. *Polysaccharide Association Structures and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, New York.
- Wang, R., Zhou, H., Siu, S.W., Gan, Y., Wang, Y., Ouyang, D. 2015. Comparison of three molecular simulation approaches for cyclodextrin-ibuprofen complexation. *J. Nanomater.* 16(1), 267.
- Watts, V. J. and K. A. Neve. 2005. "Sensitization of adenylate cyclase by Galpha i/o -coupled receptors." *Pharmacol Ther* 106(3): 405-421.
- Wei, C.; Pohorille, A. 2009. Permeation of Membranes by Ribose and its Diastereomers. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 10237-10245.

- Wu B., Crampton S.P. & Hughes C.C. 2007. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26 227-239.
- Wu Z. 2008. *Flora of China*, Volume 7 - *Menispermaceae through Capparaceae*, Science Press y Missouri Botanical Garden Press, Beijing y St. Louis.
- Xu, J., Koval, A., & Katanaev, V. L. (2020). Beyond TNBC: Repositioning of Clofazimine Against a Broad Range of Wnt-Dependent Cancers. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Zeng, X., K. Tamai, et al. 2005. "A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation." *Nature* 438(7069): 873-877.
- Zhang, H. T. 2009. "Cyclic AMP-specific phosphodiesterase-4 as a target for the development of antidepressant drugs." *Curr Pharm Des* 15(14): 1688-1698.
- Zhang, Q.-F.; Nie, H.-C.; Shangguang, X.-C.; Yin, Z.-P.; Zheng, G.-D.; Chen, J.-G. 2013. Aqueous Solubility and Stability Enhancement of Astilbin through Complexation with Cyclodextrins. *J. Agric. Food Che*

