



*FACULTAD DE  
CIENCIAS NATURALES  
Y EXACTAS*

**Predicción de la actividad moduladora sobre eventos epigenéticos de compuestos fenólicos presentes en setas comestibles-medicinales**

**Tesis presentada en opción al  
Título Académico de Master en  
Biotecnología Mención Industrial**

Autor: Lic. Javier Peña López

Tutore: Dr.C Humberto J. Morris  
Quevedo

Consultante: PhD Juan Ayala  
Serrano

## *Agradecimientos*

*A mi familia por apoyarme en todo momento, en especial a mis padres*

*A mi tutor Humberto Morris por su exhaustiva y utilísima revisión*

*A Julio Rojas, sin cuya valiosa asesoría y horas dedicadas no hubiese podido completar este trabajo y a Carlos Labadié por sus consejos*

*A mi amigo Javier Molina y a mis compañeros de trabajo, por el día a día*

*A Lisandra, especialmente, por toda su ayuda en disímiles aspectos*

*A mi primo Yordan Laborde por su algoritmo para organizar mis datos*

*Al proyecto VLIR, por proveer la Estación de Cálculos Complejos (HPC) que utilicé en este trabajo*

*Agradezco a todas las personas que, de una manera u otra me ayudaron durante el desarrollo de esta tesis...*

## Listado de Siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AP1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARPANET	Red de agencia de proyectos de investigación avanzada
BEI	Índice de eficiencia de unión
CBP	Proteína de unión a CREB
c-Myc	Protooncogen de la familia Myc
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta cAMP
DIFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
DNMT	Metiltransferasa de ADN
EAE	encefalomielitis autoinmune experimental
EGCG	epigallocatequina-3-galato
GNAT	Histona N-acetiltransferasas
HAT	Acetiltransferasa de histona
HDAC	Desacetiltransferasa de histonas
HDM	Desmetilasa de histona
HepG2	línea celular de cáncer de hígado humano
HIF-1 $\alpha$	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
HMT	Metiltransferasa de histona
LE	Eficiencia del ligando
LLE	Eficiencia lipofílica del ligando
LSD1	lisina desmetilasa específica 1
m5C	5-metil-citocina
MYST	MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas
PEI	Porcentaje / índice de eficiencia de potencia
PGC-1 $\alpha$	Coactivador gamma del receptor activado por proliferación de peroxisomas 1-alfa
SAH	S-adenosil L-homocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SIRT	miembro de la familia sirtuin
TAFII250	Factor 250 asociado a la proteína de unión a TATA
ZBTB18	Dedo de zinc y proteína que contiene el dominio BTB18

## Resumen

Las modificaciones epigenéticas ocurren en las etapas iniciales de la carcinogénesis y representan eventos potencialmente iniciadores en el desarrollo del cáncer; por ello se han identificado como nuevas dianas prometedoras para las estrategias de quimioprevención. Las setas comestibles, que se han consumido como alimentos y usado como medicinas por miles de años, son una rica fuente de metabolitos bioactivos que poseen potencial actividad sobre los eventos epigenéticos. En esta investigación *in silico* se realizó el acoplamiento molecular entre compuestos con naturaleza fenólica seleccionados por semejanza estructural con compuestos con actividad moduladora sobre el epigenoma y seis enzimas, dos metiltransferasas de ADN, dos acetiltransferasas de histonas y dos desacetilasas de histonas. El acoplamiento con la enzima metiltransferasa de ADN se realizó con cinco ligandos, siendo la hesperetina la que mostró los valores de interacción más fuertes en cuanto a los parámetros evaluados,  $\Delta G$   $-10.01 \text{ Kcal/mol}$ ,  $K_i$   $45.6 \text{ nM}$  y  $LE$   $-0.46$ , mientras que la más débil fue el pirogalol con  $\Delta G$   $-5.37 \text{ Kcal/mol}$ ,  $K_i$   $115.2 \text{ }\mu\text{M}$  y  $LE$   $-0.60$ . Para la enzima acetiltransferasa de histona, el mejor modelo de la miricetina evidenció la interacción más fuerte  $\Delta G$   $-9.60 \text{ Kcal/mol}$ ,  $K_i$   $92.3 \text{ nM}$  y  $LE$  de  $-0.48$ , mientras que la más débil fue para el ácido cumárico con  $\Delta G$   $-5.48 \text{ Kcal/mol}$ ,  $K_i$   $96.6 \text{ }\mu\text{M}$  y  $EL$  de  $-0.46$ . En el caso de la enzima desacetiltransferasa de histonas, todos los modelos obtuvieron resultados semejantes, el valor de interacción más fuerte fue para la hesperetina con  $\Delta G$   $-8.53 \text{ Kcal/mol}$ ,  $K_i$  de  $559.2 \text{ nM}$  y  $EL$  de  $-0.39$ , mientras que el más débil fue la crisina con  $\Delta G$   $-8.03 \text{ Kcal/mol}$ ,  $K_i$  de  $1.29 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $EL$   $-0.42$ . Los valores obtenidos de los parámetros estudiados sugieren la posible interacción molecular entre estas enzimas con sus ligandos fenólicos y en consecuencia el potencial efecto modulador de eventos epigenéticos relevantes en la quimioprevención del cáncer.

## Palabras claves

Acoplamiento molecular, cáncer, descriptor de afinidad, eficiencia del ligando, quimioprevención

## **Abstract**

Epigenetic modifications occur in the early stages of carcinogenesis and represent potentially initiating events in the development of cancer. Therefore, they have been identified as promising new targets for chemoprevention strategies. Edible mushrooms, which have been consumed as food and used as medicines for thousands of years, are a rich source of bioactive metabolites that have potential activity on epigenetic events. In this *in silico* investigation, the molecular docking between phenolic compounds selected by their structural similarity with epigenome modulating compounds and six enzymes, two DNA methyltransferases, two histone acetyltransferases and two histones deacetylases was carried out. The docking with the DNA methyltransferase enzyme was performed with five ligands, and hesperetin showed the strongest interaction in terms of the parameters evaluated,  $\Delta G$  -10.01 Kcal / mol,  $K_i$  45.6 nM and LE -0.46, while the weakest was pyrogallol with  $\Delta G$  -5.37 Kcal / mol,  $K_i$  115.2  $\mu$ M and LE -0.60. For the histone acetyltransferase, the myricetin model showed the robust interaction  $\Delta G$  -9.60 Kcal / mol,  $K_i$  92.3 nM and LE of -0.48, while the weakest was for coumaric acid with  $\Delta G$  -5.48 Kcal / mol,  $K_i$  96.6  $\mu$ M and EL of -0.46. In the case of the histones deacetylases enzyme, all models obtained similar results, and the strongest interaction was observed for hesperetin with  $\Delta G$  -8.53 Kcal / mol,  $K_i$  of 559.2 nM and EL of -0.39, while the weakest was the chrysin with  $\Delta G$  -8.03 Kcal / mol,  $K_i$  of 1.29  $\mu$ M, EL -0.42. The values obtained from the studied parameters suggest the possible molecular interaction between these enzymes with their phenolic ligands and consequently the potential modulating effect of relevant epigenetic events in cancer chemoprevention.

## **Keywords**

Molecular docking, cancer, affinity descriptor, ligand efficiency, chemoprevention

# Índice

<b>Introducción</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
1.1 Las setas comestibles y compuestos bioactivos .....	4
1.1.1 Polifenoles y epigenética .....	4
1.2 Mecanismos de modificación epigenética .....	6
1.2.1 Metilación del ADN .....	6
1.2.2 Modificación de Histonas .....	8
1.3 Bioinformática .....	9
1.3.1 Cribado virtual.....	10
1.3.2 Similitud Estructural .....	12
1.3.3 Acoplamiento Molecular.....	13
1.3.3.1 Interacciones intermoleculares .....	14
<b>CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
2.1 Diseño del experimento y herramientas informáticas.....	17
2.2 Representación y optimización de la geometría de los fenoles .....	18
2.3 Representación y optimización de las enzimas.....	18
2.4 Configuración del acoplamiento molecular .....	19
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
3.1 Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos con la enzima ADN metiltransferasa (DNMT).....	20
3.2 Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos con la enzima Acetiltransferasa de Histona HAT .....	27
3.3 Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos con la enzima Desacetilasa de Histonas HDAC.....	32
<b>Conclusiones</b> .....	37
<b>Recomendaciones</b> .....	38
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	39

## Introducción

El término epigenética se define como el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica sin modificar la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN), que son heredables, pero potencialmente reversibles (J. Huang *et al.*, 2011). Estos mecanismos representan un puente entre las influencias genéticas y el fenotipo, por lo que favorecen la expresión de genes o no según las condiciones ambientales. Son esenciales en la diferenciación celular y tisular durante el desarrollo embrionario, y también, en los organismos adultos. De tal manera, las células sufren cambios epigenéticos durante toda su vida (Selzer *et al.*, 2018).

Dados los desafíos de la terapia contra el cáncer, la "quimiopreención", que utiliza agentes farmacológicos o naturales para impedir, detener o revertir la carcinogénesis en sus primeras etapas, sigue siendo el enfoque más práctico y prometedor para el tratamiento de pacientes con cáncer (Iridoy Zulet *et al.*, 2017). Numerosos compuestos han mostrado potencial actividad quimiopreventiva frente al cáncer mediante su acción sobre los principales mecanismos epigenéticos (metilación del ADN, acetilación, metilación de histonas y micro ARNs). Sin embargo, la creación de largas librerías de compuestos candidatos mediante los ensayos *in vitro* y posteriormente *in vivo* es un proceso que requiere grandes cantidades de tiempo, dinero y personal especializado. En este contexto, las herramientas bioinformáticas ofrecen una solución inicial para discriminar compuestos que poseen poca actividad.

El modelado computacional y la simulación biomolecular han sido herramientas biofísicas indispensables para la investigación y el descubrimiento de nuevos fármacos. Ellos complementan la información estructural de experimentos biofísicos con probabilidades de ensamblaje configuracional de sistemas de proteínas de interés. Por lo que, a nivel atómico, la información de dinámica proteica se puede tener en cuenta durante el proceso de dilucidación del fármaco, incluyendo los solventes. Estos enfoques *in silico* ayudan a orientar las fases de identificación y optimización, y pueden disminuir efectivamente los costos del desarrollo industrial de medicamentos (Vellore y Baron, 2014).

Las setas comestibles se han consumido como alimentos y usado como medicina por miles de años. Se ha manifestado un incremento en su producción y cultivo en todo el mundo debido a sus propiedades organolépticas y potencialidades como alimento funcional. Además, su utilización como descomponedores de materia orgánica (cáscara de coco, paja de arroz, pulpa del café, entre otros) les confiere una utilidad práctica a esos desechos agroindustriales que contaminan el medio ambiente (Saval, 2012).

Igualmente, las setas han sido valoradas como una nueva fuente de sustancias bioactivas con potenciales efectos terapéuticos, tales como: antitumoral, inmunomodulador, antioxidante, genoprotector, antiinflamatorio, antimicrobiano, antiviral, entre otras. Los productos derivados de ellas están siendo investigados de

manera creciente y son recomendados por profesionales de la salud para la prevención de distintas enfermedades crónicas (Beelman *et al.*, 2019).

La mayor parte de las investigaciones relacionadas con el aislamiento y evaluación de sustancias con actividad antitumoral e inmunomodulador a partir de setas comestibles-medicinales, se han enfocado a compuestos de alta masa molecular (principalmente polisacáridos del tipo  $\beta$ -(1-3)-(1-6) glucanos y, en consecuencia, el estudio de los metabolitos de baja masa molecular ha sido poco explorado. En trabajos recientes se han realizados estudios *in silico* para evaluar el potencial efecto modulador antitumoral, epigenético y antioxidante de compuestos fenólicos derivados de setas comestibles medicinales (Aguirre *et al.*, 2018; Beltran-Delgado *et al.*, 2019).

De ahí nuestro interés en profundizar en la investigación de las potencialidades de los compuestos de baja masa molecular como los fenoles, utilizando un enfoque predictivo, que nos permita evaluar su posible actividad sobre eventos epigenéticos.

Los resultados de este trabajo permitirían sugerir un grupo de fenoles derivadas de setas comestibles-medicinales con potenciales efectos quimiopreventivos/terapéuticos frente al cáncer mediante sus posibles efectos moduladores de eventos epigenéticos.

El uso de herramientas computacionales permitirá realizar un análisis de los potenciales efectos quimiopreventivos/terapéuticos de fenoles aisladas de setas comestibles-medicinales frente al cáncer mediante sus posibles efectos moduladores sobre eventos epigenéticos. Con esta investigación es posible minimizar el tiempo de trabajo durante la discriminación de compuestos inactivos y aumentar la velocidad de dilucidación de compuestos líderes en la industria médico-farmacéutica.

### **Problema científico**

¿Existirán interacciones moleculares entre los fenoles derivados de setas comestibles y las enzimas involucradas en la señalización de eventos epigenéticos?

### **Hipótesis**

Es posible predecir el potencial efecto modulador de eventos epigenéticos de fenoles presentes en setas comestibles mediante el estudio del acoplamiento molecular como base para proponer posibles efectos quimiopreventivos *in silico*.

### **Objetivo General**

Evaluar el potencial efecto modulador *in silico* de fenoles derivadas de setas comestibles-medicinales sobre la señalización de eventos epigenéticos.

## **Objetivos Específicos**

- 1- Evaluar mediante acoplamiento molecular, la posible interacción de diferentes compuestos fenólicos de setas comestibles frente a las enzimas HAT, HDAC y DNMT.
- 2- Seleccionar los mejores modelos de las interacciones entre los compuestos fenólicos y las enzimas implicadas en las señalizaciones epigenéticas según los parámetros empleados ( $\Delta G$ ,  $K_i$ , LE).

## CAPÍTULO 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Las setas comestibles y compuestos bioactivos

Las setas comestibles se han consumido como alimento y como medicina por milenios. Su producción se ha incrementado más de 30 veces a nivel mundial desde 1978, mientras que la población solo ha aumentado alrededor de 1,7 veces durante el mismo período (Royse *et al.*, 2017). El consumo per cápita mundial se ha multiplicado por 4.7 desde 1978. El principal incremento se ha producido en China y Estados Unidos. Según datos del 2017, se presenta en la figura 1 la producción mundial por géneros, siendo *Lentinula* el de mayor producción.

Generalmente todas las setas comestibles poseen tres propiedades de alimentos: nutrición, gusto y función fisiológica. La primera propiedad (valor nutricional) que tienen los hongos, contenido rico en proteínas, quitina (fibra dietética), vitaminas y minerales, bajo contenido de grasas pero con una alta proporción de ácidos grasos insaturados y no tienen colesterol. En cuanto a los efectos nutricionales beneficios de los hongos, poseen un bajo nivel energético, el cual es importante para la reducción del peso (Chang y Wasser, 2012).

También poseen niveles considerables de purinas que es beneficiosa para la dieta de personas que sufren enfermedades metabólicas (como el reumatismo, la gota). Además poseen un bajo nivel de glucosa y mayor de manitol, que es especialmente beneficioso para la diabetes. Poseen bajas concentraciones de sodio, siendo beneficioso para la dieta de personas que padecen enfermedades de presión alta. Un alto contenido de vitaminas que constituyen un importante aspecto ortomolecular, por lo que una parte importante del requerimiento diario de vitaminas se pueden cubrir consumiendo setas. Contiene un alto contenido de selenio que es considerado un excelente antioxidante (Chang y Wasser, 2012).

La segunda propiedad, el gusto, las setas son consideradas como un alimento esquisito y como fuente de saborizante alimenticio por sus sabores únicos. Favorecidos por la presencia de compuestos volátiles de ocho carbonos, solubles en agua como azúcares, polioles, ácidos orgánicos, aminoácidos y nucleótidos 5' libres. La tercera propiedad, las setas contienen sustancias fisiológicamente activas, como los polisacáridos de alto peso molecular, heteroglucanos, sustancias quitinosas, peptidoglucanos proteoglucanos, lectinas, componentes de ARN, fibras dietéticas y sustancias orgánicas de bajo peso molecular como terpenoides, esteroides y fenoles. Por todo esto, las setas comestibles-medicinales son consideradas un alimento valioso en la sociedad moderna (Chang y Wasser, 2012).

#### 1.1.1 Polifenoles y epigenética

Los polifenoles son compuestos orgánicos naturales, sintéticos o semisintéticos con múltiples grupos fenólicos en la estructura. Típicamente contienen uno o más anillos aromáticos con grupos hidroxilo unidos a ellos, son posiblemente, el grupo más grande de sustancias químicas presentes en los vegetales (Bravo, 1998; Del Rio *et al.*, 2013).

Los polifenoles se han utilizado para reducir la morbilidad y/o ralentizar la progresión de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cancerosas. El mecanismo de acción de los polifenoles se relaciona fuertemente con su actividad antioxidante. Se conoce que los polifenoles disminuyen el nivel de especies reactivas de oxígeno en el organismo humano. Además, las propiedades promotoras de la salud de los polifenoles comprenden efectos antiinflamatorios, antialérgicos, antiaterogénicos, antitrombóticos y antimutagénicos (Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018).

Dentro de esta familia de compuestos se han identificado más de 8,000 moléculas con estructura flavonoide y su consumo promedio por los humanos varía ampliamente. Los flavonoides ejercen una amplia gama de propiedades bioquímicas y farmacológicas, siendo uno de los efectos más investigados su actividad preventiva contra el cáncer. Los efectos protectores del cáncer de los flavonoides se han atribuido a una amplia variedad de mecanismos, que incluyen la eliminación de radicales libres, la modificación de enzimas que activan o desintoxican carcinógenos e inhiben la inducción de la actividad del factor de transcripción AP1 por los promotores tumorales (Thakur *et al.*, 2014).

Recientemente se ha sugerido que los polifenoles muestran la capacidad para revertir condiciones patológicas adversas relacionadas con la regulación epigenética, como la obesidad, desordenes metabólicos, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, y varias formas de cáncer. Muchos estudios reportan que los algunos polifenoles son capaces inhibir la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas o cambiar la disponibilidad de sustrato necesaria para estas reacciones enzimáticas (Russo *et al.*, 2017).

El primer compuesto descrito en la literatura capaz de promover la actividad de la enzima desacetilasa de histona dependiente de NAD (SIRT1) fue el resveratrol, un compuesto polifenólico natural. Se ha demostrado que es capaz de prolongar la vida en organismos como ratas, levaduras, abejas, gusanos moscas, peces (Sippl *et al.*, 2019). Otro de los polifenoles más estudiado con actividad sobre la enzima ADN metiltransferasa (DNMT) es el epigallocatequina-3-galato EGCG derivado del té verde.

Actualmente se conocen un grupo de fenoles que están contenidos en las setas comestibles-medicinales que poseen actividad *in vitro* sobre enzimas que realizan marcas epigenéticas, como la quercetina, la hesperetina, el ácido cafeico. Varios estudios revelan que esos compuestos inhiben varios procesos celulares asociados al cáncer. En particular ellos bloquean el desarrollo y progresión de tumores dirigido a transducción de señalización clave que dan como resultado la restauración del gen supresor de tumores e inhibición de la expresión de oncogenes (Carlos-Reyes *et al.*, 2019).

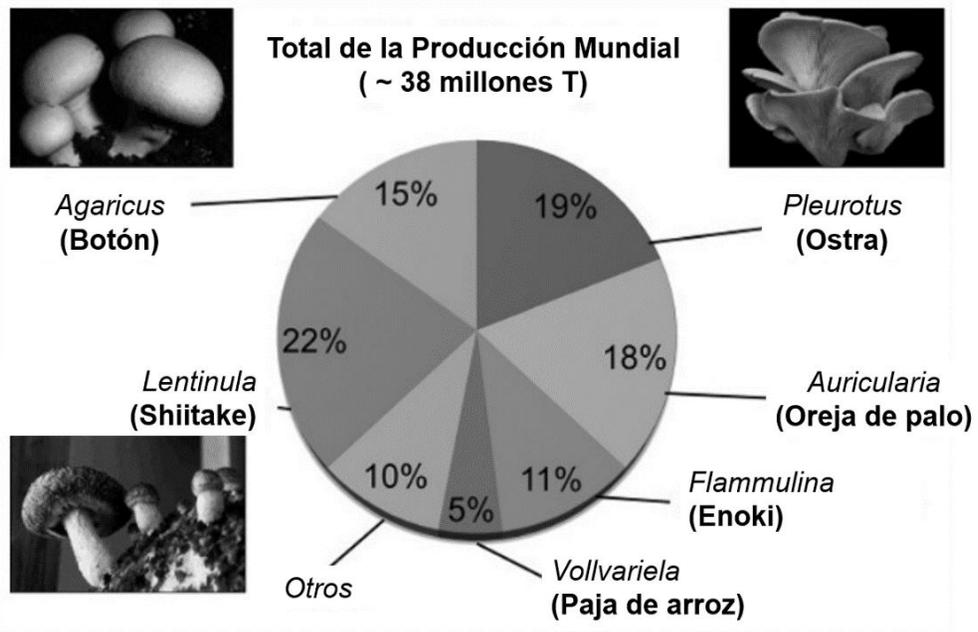


Figura 1. Estadísticas de producción mundial de las principales especies de hongos. (Royse *et al.*, 2017)

## 1.2 Mecanismos de modificación epigenética

La epigenética estudia los factores no genéticos que intervienen en el desarrollo de un organismo; es la regulación heredable de la expresión génica sin cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN. El término epigenética fue acuñado por Conrad H. Waddington en 1953 para referirse al estudio de las interacciones entre los genes y el ambiente que se producen en los organismos. Por medio de la regulación epigenética se puede observar cómo funciona la adaptación al medio ambiente dada por la plasticidad del epigenoma. Entre los mecanismos más estudiados se encuentran la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas (Sippl *et al.*, 2019).

### 1.2.1 Metilación del ADN

La metilación en los residuos de citosina con las secuencias C-G es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en animales. Constituye un componente esencial de la maquinaria epigenética celular, junto a las modificaciones de las histonas, regulan la expresión génica modulando el empaquetado del ADN y la estructura de la cromatina. La metilación del ADN es una modificación química que involucra la transferencia de un grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) de un donador como el S-adenosil metionina (SAM) en la posición 5' del residuo de citosina que precede a la guanina en las secuencias CG, formando 5-metilcitosina y S-Adenosil L-homocisteína (SAH) (Shankar *et al.*, 2016). Este hecho afecta a la transcripción genética de forma directa, mediante un desplazamiento del punto de unión habitual de los factores de transcripción y el promotor del gen, y de forma indirecta, atrayendo proteínas de unión a las citosinas metiladas. En ambos casos el proceso lleva al silenciamiento genético, es decir, provoca que ciertos genes no se expresen (Díaz-Lagares, 2018).

Se ha reportado que la información genética de los mamíferos contiene alrededor de  $\sim 3 \times 10^7$  residuos de 5-metil-citosina (m5C), principalmente dentro de secuencias dinucleotídicas 5'-m5CG-3 (Bestor, 2000). La metilación del ADN puede cambiar el estado funcional de las regiones reguladoras, pero no cambia el emparejamiento de bases de citosina. De este modo, presenta la clásica marca "epigenética" y participa funcionalmente en muchas formas de represión epigenética estable, como la impronta, la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento del ADN repetitivo. En los vertebrados, la metilación hereditaria solo ocurre en los dinucleótidos CpG. La simetría de las secuencias CpG permite la propagación de la marca de metilo a través de la división celular; En 1975, ello se propuso como una vía para la memoria celular de los estados transcripcionales (Schübeler, 2015; Shankar *et al.*, 2016).

Aunque las secuencias de CG se distribuyen de manera desigual en todo el genoma humano, con frecuencia están enriquecidas en los promotores genéticos (a menudo denominados islas CpG) y en secuencias repetitivas grandes como en los retrotransposones LINE y ALU (Bird, 2002). Las enzimas ADN metiltransferasas (DNMT) son las encargadas de metilar, en los mamíferos, la gran mayoría de los

islotos CpG, mientras que estos islotos dentro de los promotores de genes tienden a estar protegidas de la metilación (Bird, 2002; Issa y Kantarjian, 2009).

En enfermedades como el cáncer, se ha observado un incremento de la metilación del ADN en las islas CpG en la región promotora de algunos genes que funcionan como un "interruptor" responsables del silenciamiento de los oncogenes. No obstante no se ha identificado ninguna mutación o deficiencia en ningún DNMT como causalmente ligada al desarrollo del tumor, probablemente debido a su papel crítico durante la embriogénesis. Hasta el momento, hay tres metiltransferasas principales de ADN (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) identificadas en los mamíferos (Bestor, 2000; Shankar *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la enzima DNMT1 tiene una preferencia de 5 a 30 veces mayor para los sustratos hemimetilados, por lo que se denomina popularmente como metiltransferasa de mantenimiento. Conserva los patrones de metilación existentes en las cadenas de ADN hijas al agregar grupos metilo a las secuencias CpG hemimetiladas después de la replicación. Se ha demostrado que DNMT1 está involucrado en la actividad de la metilación *de novo* en los lisados de embriones y se demostró que su especificidad de secuencia se limita a la secuencia de dinucleótidos 5'-CpG-3' con poca dependencia del contexto de secuencia o densidad (Bestor, 2000; Shankar *et al.*, 2016).

Las enzimas DNMT3a y DNMT3b son esenciales para la metilación global *de novo*, ya que se dirigen preferentemente a secuencias CpG no metiladas. Aunque DNMT3L, el cuarto miembro de la familia, carece de actividad intrínseca de DNMT, se co-localiza con DNMT3a y DNMT3b para establecer huellas genómicas en la línea germinal materna y facilitar la metilación de los retroposones. Se encontró que DNMT2, otro miembro "enigmático" de la familia DNMT, carece de cualquier actividad DNMT detectable bioquímicamente. Las evidencias de los análisis fenotípicos de ratones con genes DNMT mutantes han proporcionado información útil sobre el mecanismo y el establecimiento de patrones de metilación del ADN durante el desarrollo (Bestor, 2000; Shankar *et al.*, 2016; Stadler *et al.*, 2011).

El silenciamiento génico suele asociarse con la hipermetilación de las islas CpG. Hay múltiples mecanismos a través de los cuales la metilación del ADN puede suprimir la transcripción. Uno general es excluir la unión de proteínas que modulan la transcripción a través de sus dominios de unión al ADN (Hon *et al.*, 2013). Se ha demostrado que este mecanismo es esencial para la impresión del gen Igf2. También se ha demostrado que la metilación de CpG bloquea la unión de varios otros factores de transcripción (Schübeler, 2015). Los avances en las tecnologías han permitido construir mapas genómicos de metilación del ADN con una resolución sin precedentes, revelando que las secuencias reguladoras que están activas no se encuentran metiladas. A pesar de estas observaciones sorprendentes pero correlativas, nuestra capacidad para asignar correctamente una función a la presencia local de la metilación del ADN en genes particulares se ha mantenido sorprendentemente limitada (Schübeler, 2015).

## 1.2.2 Modificación de Histonas

Además de la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de histonas en posición N-terminal juega un rol significativo en la regulación epigenética de la expresión de genes. Una unidad nucleosomal típica consta de aproximadamente 146 pb de ADN envuelto alrededor de un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) y representa la unidad fundamental de construcción de la cromatina en eucariotas. Una gama diversa de modificaciones químicas covalentes menos estructuradas, una prominente cola N-terminal de histonas centrales por metilación, acetilación, ubiquitinación, fosforilación, sumoilación y ADP-ribosilación regula la dinámica del estado de la cromatina (Shankar *et al.*, 2016).

La eucromatina es una forma de cromatina ligeramente empaquetada donde el ADN esta accesible para la transcripción, mientras que la heterocromatina representa un estado de cromatina fuertemente empaquetado, inaccesible para la maquinaria de la transcripción celular. La mayoría de las modificaciones químicas se producen en los residuos de lisina (K), arginina (R) y serina (S) dentro de las colas de histonas. Estas distintas modificaciones de histonas en una o más colas (a menudo denominadas "código de histonas") que pueden actuar secuencialmente o en combinación, son reconocidas por otras proteínas que señalan otros eventos posteriores (Shankar *et al.*, 2016).

Se han implicado varias enzimas en la catálisis (adición o eliminación) de varias modificaciones las de histonas. Los ejemplos incluyen histonas acetiltransferasas (HAT), histonas desacetilasas (HDAC), histonas metiltransferasas (HMT), histonas desmetilasas (HDM), histonas quinasas. En resumen, los HAT catalizan la adición de acetilo al grupo  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina en la cola N-terminal de las histonas, que neutraliza la carga positiva, relaja la cromatina y facilita la unión de la maquinaria transcripcional al ADN. Hasta la fecha, se han caracterizado 25 HAT que están divididas en cuatro familias: GNAT (hGCN5, PCAF), MYST (MYST, Tip60), p300 / CBP (p300 / CBP, SRC (SRC-1) y TAFII250 (Bannister y Kouzarides, 2011; Shankar *et al.*, 2016).

En contraste con la acetilación, la desacetilación de histonas conduce a la condensación de la cromatina y la represión transcripcional. Hasta ahora, han sido clasificadas 18 enzimas con actividad HDAC. Los HDAC 1-11, están subdivididas en cuatro clases I, II, III y IV, basados en homología, tamaño, expresión subcelular y número de dominios enzimáticos. Las HDAC -1, -2, -3 y -8 son miembros de la familia HDAC de clase I, mientras que HDAC -4, -5, -6, -7, -9 y -10 pertenecen a la familia HDAC de clase II. HDAC-11 pertenece al grupo HDAC de clase IV, mientras que las de la clase III son las sirtuinas 1-7, SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 y SIRT7, y no están estructuralmente relacionada con las de clase I y II y requiere NAD<sup>+</sup> como cofactor para la actividad (Bannister y Kouzarides, 2011; Gerhauser, 2012).

Los HMT catalizan la adición de grupos metilo a los residuos K o R, mientras que los HDM actúan para eliminarlos. Los ejemplos de histona lisina metiltransferasa

incluyen gen EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) y el de histona lisina desmetilasa incluye el LSD1 (lisina desmetilasa específica 1) (Shankar *et al.*, 2016).

Dependiendo del sitio de la metilación de la lisina (K4, K9, K27 en la histona H3) y del estado de la metilación (mono, di o tri metilación), la metilación de la histona puede tener un efecto activador o silenciador en la expresión génica. La metilación de H3K4, H3K36 y H3K79 tiene efectos activadores sobre la transcripción de genes, mientras que la metilación de H3K9, H3K27 y H4K20 se asocia generalmente con el silenciamiento de los genes o la represión transcripcional. Existen revisiones disponibles en cada grupo de enzimas modificadoras de histonas, su mecanismo de acción y varias modificaciones para el desarrollo de biomarcadores y ensayos moleculares (Ma y Zhang, 2016; Shankar *et al.*, 2016; Upadhyay y Cheng, 2011).

### 1.3 Bioinformática

La bioinformática es una disciplina relativamente joven, pero su utilización se ha incrementado hasta la actualidad en las ciencias relacionadas con la vida, como la biología, bioquímica, genética, medicina y química. Needleman y Wunsch publicaron el primer algoritmo para comparar secuencias de proteínas o ADN en 1970. La bioinformática es solo 1 año más joven que el progenitor de Internet, ARPANET y 1 año más antigua que el correo electrónico, inventado por Ray Thomlinson en 1971. Sin embargo, el término bioinformática solo se acuñó en 1978 y se definió como el "estudio de procesos informáticos en sistemas bióticos". Hoy en día, las técnicas de bioinformática, como el algoritmo de la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST), las comparaciones de secuencias por pares y múltiples, las consultas de bases de datos biológicas y los análisis filogenéticos, se han convertido en herramientas familiares para los científicos (Hogeweg, 1978; Selzer *et al.*, 2018).

Desde sus inicios y a fines de la década de 1980, el éxito de la bioinformática se ha asociado con rápidos desarrollos de gran relevancia en la informática, especialmente en el hardware y el software. Además, los avances biotecnológicos, como los que se han visto en los campos de la secuenciación del genoma, los microarreglos y la proteómica, han contribuido enormemente al auge de la bioinformática. Finalmente, el avance y éxito simultáneo de la World Wide Web ha facilitado la distribución mundial y el fácil acceso a las herramientas de la bioinformática (Selzer *et al.*, 2018).

El Brookhaven Protein Data Bank (PDB) también se fundó en 1971. PDB es una base de datos para el almacenamiento de datos cristalográficos de proteínas. La publicación del proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis y sus colegas en 1986 representó un hito en la biología molecular y al mismo tiempo, en la bioinformática (Mullis *et al.*, 1986). En el mismo año, se fundó la base de datos SWISS-PROT, y Thomas Roderick acuñó el término genómica, describiendo la disciplina científica de la secuenciación y la descripción de genomas completos (Kuska, 1998).

Dos años más tarde, se constituyó el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI); En la actualidad, opera una de las bases de datos primarias más importantes (figura 2). El mismo año también se inició la Iniciativa del Genoma Humano y la publicación del algoritmo FASTA. En 1991, el Consejo Europeo de Investigación Nuclear (CERN) lanzó los protocolos que hicieron posible la World Wide Web (Selzer *et al.*, 2018).

La Web permitió, por primera vez, proporcionar un acceso fácil a las herramientas de bioinformática. Sin embargo, pasaron algunos años hasta que tales herramientas realmente estuvieran disponibles. Además, en 1991, Greg Venter publicó el uso de Marcador de Secuencia Expresada (EST). Al año siguiente, Venter y su esposa, Claire Fraser, fundaron el Instituto de Investigación Genómica (TIGR). Con la publicación de GeneQuiz en 1994, apareció una herramienta de análisis de secuencia totalmente integrada que, en 1996, se utilizó en el proyecto GeneCrunch para el primer análisis automático de las más de 6000 proteínas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996; Selzer *et al.*, 2018).

En ese mismo año, fue anunciado el lanzamiento de la base de datos *Prosite*. Un año después se implementó satisfactoriamente el paquete *GeneQuiz* con análisis de secuencias automáticas y *LION Biosciences AG* fue fundado en Heidelberg, Alemania. Las bases de uno de los principales productos de *LION*, los paquetes de análisis de secuencias integradas, condicionado por *bioSCOUT*, fue *GeneQuiz*. Junto con otros productos del Sistema de Recuperación de Secuencias (SRS), *LION Biosciences AG* rápidamente se volvió una compañía bioinformática satisfactoria con presencia en la red de redes. Sin embargo, en el 2006 la división bioinformática fue vendida a BioWisdom, que había continuado la modificación y venta del SRS (Selzer *et al.*, 2018).

En ese tiempo, el SRS fue claramente uno de los sistemas más importantes por la indexación y gestión de archivos en bases de datos. La importancia del SRS ha disminuido en los años recientes, sin embargo, algunos paquetes de instalación aún se comercializaba en la web (Selzer *et al.*, 2018).

### 1.3.1 Cribado virtual

Al empleo de métodos computacionales para la identificación, diseño o análisis del potencial farmacológico de una sustancia se le conoce como cribado virtual. Para desarrollar un protocolo de cribado virtual es necesario al menos tres pasos, el primero es la preparación de las estructuras, el filtrado y la prueba *in silico*. Luego se pueden añadir pruebas, un modelo descriptivo con los resultados obtenidos o iniciar el protocolo nuevamente para refinar los resultados. El “curado” es el paso más lento, pero determinante. Consiste en seleccionar de manera correcta las estructuras químicas a emplear, la geometría, cargas y quiralidad adecuadas de los compuestos de interés. Los compuestos pueden proceder de bases de datos públicas y los mismos deben depurarse, ya que suelen tener errores. La alternativa es usar compuestos identificados por un grupo de investigación o hacer la propuesta teórica de nuevas estructuras (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019).

Para el filtrado es necesario seleccionar los compuestos que cumplan mejor los criterios de interés. Las pruebas *in silico* son simulaciones que pueden incluir, la similitud química, acoplamiento molecular y dinámica molecular. Los resultados obtenidos de estos ensayos *in silico* son probabilísticos, por lo que no asevera que se ha descubierto o diseñado un nuevo fármaco hasta comprobarlo en pruebas biológicas. Pero es de destacar que, aunque las técnicas computacionales no podrán sustituir a las pruebas biológicas, son herramientas invaluable para la optimización del tiempo y recursos. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos representativos de fármacos identificados con la participación del cribado virtual (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019).

La diversidad de compuestos químicos se ha comparado con el universo cósmico y se han hecho analogías entre el número de compuestos químicos que puedan existir con el número de estrellas. Sobre el número de compuestos, estudios recientes hablan de valores que van desde  $10^{40}$  hasta  $10^{200}$ . Esto lleva a la reflexión de cuánto y qué tanto se conoce este “universo químico”. En la misma analogía con el universo cósmico se ha intentado catalogar y delimitar este espacio, por ejemplo, definir “galaxias químicas” en función de su actividad química, su reactividad, toxicidad, etc. (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019; Virshup *et al.*, 2013).

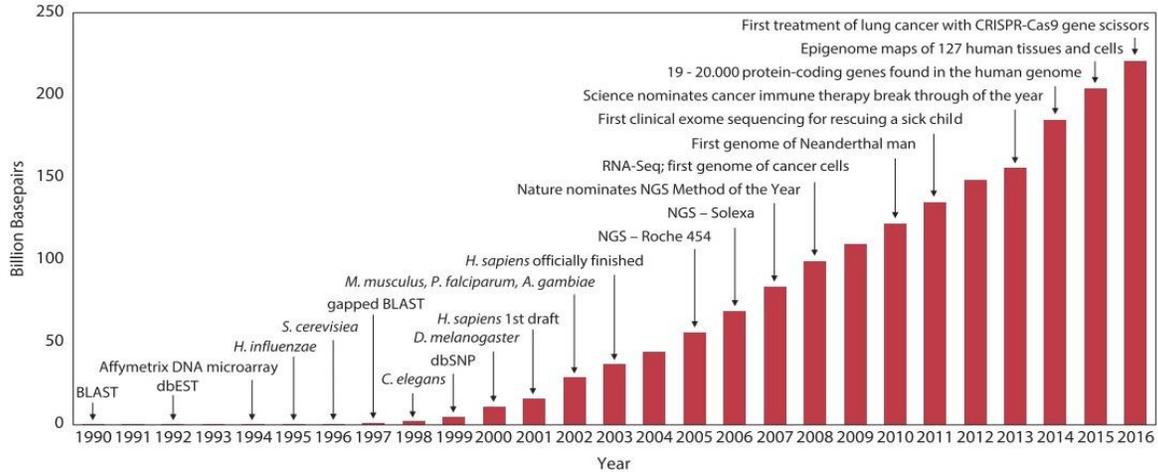


Figura 2. Desarrollo de la base de datos del GenBank del NCBI en relación con algunos hitos de la bioinformática (Selzer *et al.*, 2018).

Tabla 1: Ejemplos de fármacos desarrollados por métodos DIFAC (Diseño de Fármacos Asistido por Computadora)

Nombre	Compañía farmacéutica que lo desarrolló	Uso
Captopril	Bristol Myers-Squibb	Inhibidor de la ECA (Enzima convertidora de angiotensina) (Antihipertensivo)
Oseltamivir	Gilead Sciences	Inhibidor de la neuraminidasa (Antiviral)
Dorzolamida	Merck	Inhibidor de la AC- $\alpha$ (Glaucoma)
Aliskiren	Novartis	Inhibidor de renina (Antihipertensivo)
Boceprevir	Schering-Plough	Tratamiento de la Hepatitis C (Antiviral)

\*Tomado de Prieto-Martínez y Medina-Franco (2019)

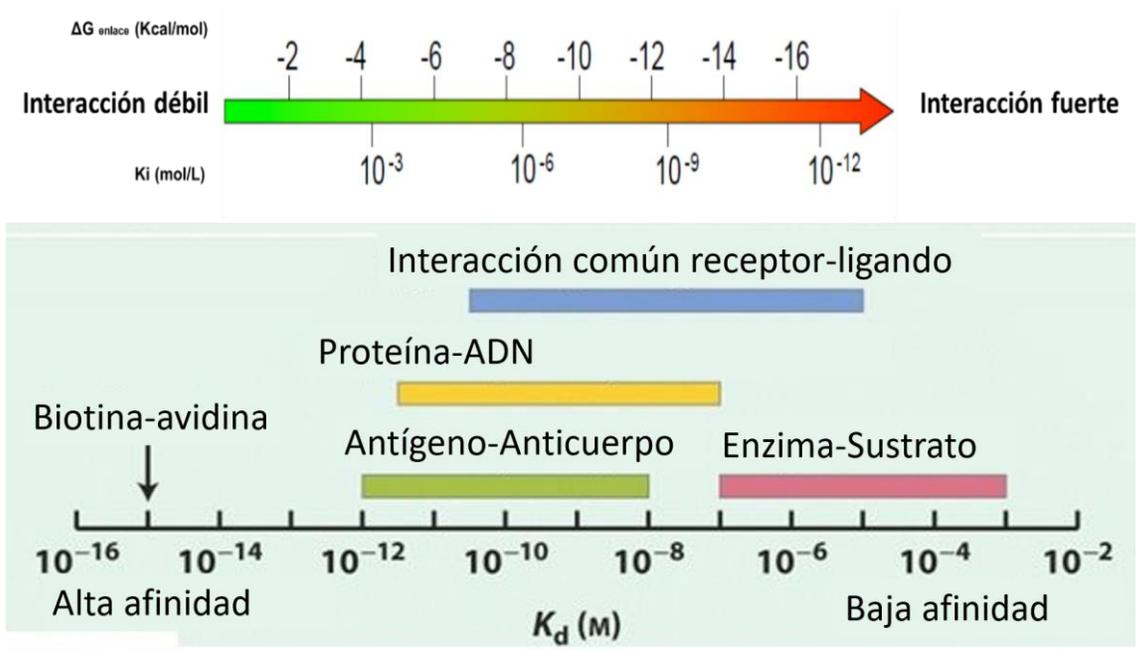


Figura 3. Relación entre magnitudes químico-físicas ( $\Delta G$  y  $K_i$ ) y la fortaleza de interacción del complejo enzima-sustrato. Tomado de Nelson y Cox (2009)

### 1.3.2 Similitud Estructural

Una forma directa y rápida para comparar estructuras químicas en forma sistemática es mediante el tipo de átomos y cómo están conectados entre sí para establecer la semejanza de los grupos funcionales. Para medir cuantitativamente la similitud entre dos moléculas en forma consistente, son necesarios dos elementos: A) una representación sistemática y consistente de las estructuras y B) una métrica (o coeficiente) de similitud (Bender *et al.*, 2009; Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019).

Una forma de codificar de manera sistemática la identidad y conectividad de los átomos es empleando las “huellas digitales moleculares” (molecular fingerprints). Se pueden distinguir dos tipos principales: unas basadas en los fragmentos y otras en la topología. Los primeros utilizan fragmentos de referencia y se hace un “pase de lista” sobre las estructuras químicas marcando como presente (1) o ausente (0) cada fragmento del listado. Una de las limitaciones de este método es que, al conocer una huella digital de una molécula, se puede saber si este fragmento está presente o no, pero no se conoce su ubicación en la estructura. Además, la representación depende de los fragmentos que comprenden la lista de referencia. Esto quiere decir que se pierde información sobre la estructura, específicamente sobre su conectividad. Ejemplos de estas huellas digitales son MACCS keys que se compone de 166 fragmentos o más y Pubchem fingerprint con 881 fragmentos (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019; Saldívar-González *et al.*, 2017).

En las huellas digitales basadas en la topología, se emplea la conectividad propia de las moléculas. El proceso inicia seleccionando un átomo central, para determinar los enlaces y átomos vecinos a una distancia determinada. Estos “caminos”, serán los que se comparen entre una estructura y otra. Por tanto, en este caso se construye una representación “más fiel” de la molécula, con el inconveniente de que la similitud será en general, más baja respecto a la representación por fragmentos pues las estructuras deberán tener conectividad semejante. En algunos casos no es posible distinguir estructuras con suficiente sensibilidad para arrojar una representación única. Esto sucede con frecuencia con los isómeros. Por esta razón, cuando se trabaja con enantiómeros se debe estar bien seguro de que la estereoquímica sea considerada correctamente en pasos posteriores de un cribado. (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019)

Entonces, utilizando las huellas digitales moleculares, es posible hacer una relación matemática en la que se puedan medir sus semejanzas. Esta operación se conoce como Coeficiente de Tanimoto.  $T(X, Y) = \frac{c}{a+b-c}$  donde a y b representan al número de fragmentos totales que tienen los compuestos X e Y; mientras que c representa el número de fragmentos que comparten ambos compuestos. Al ser un cociente, el valor de similitud sólo podrá ir de 0 (compuestos que no comparten ningún fragmento, por ejemplo, totalmente diferentes) y 1 (compuestos iguales o que comparten exactamente el mismo número de fragmentos) (Méndez-Lucio *et al.*, 2016).

Existen otras métricas además del coeficiente de Tanimoto, particularmente, como una función de distancia, se pueden hacer comparaciones matemáticas como la Distancia Euclidiana, Manhattan o Soergel. Otros coeficientes que se pueden emplear son: Similitud coseno o Coeficiente Sorensen-Dice. La principal importancia de la búsqueda de la semejanza molecular, radica en la predicción de una posible actividad alterna. Por ejemplo, se sabe que el omeprazol y sus derivados, además de ser útiles en el tratamiento de la gastritis, tienen una actividad antiparasitaria significativa. También permite la identificación de moléculas que se unen a más de un receptor (Bajusz *et al.*, 2015; Pérez-Villanueva *et al.*, 2011).

Anteriormente, las moléculas que poseían efectos secundarios no deseables, usualmente eran descartadas. Sin embargo, empleando el reposicionamiento, es posible identificar moléculas que actúan como “llaves maestras” y efectivas en varios padecimientos. Ejemplo de esto son los flavonoides; particularmente la hesperetina, pues posee diversas actividades biológicas como antiparasitarias, antiinflamatorias, sedantes, antioxidantes, etc., convirtiéndolos en polifármacos. Muchas veces, se obtienen compuestos con baja similitud estructural y es un error desechar estas moléculas, ya que por el principio de similitud es posible que exista una actividad semejante. Si al final resultan activos, se habrá identificado una nueva estructura con la actividad biológica esperada (bioisótero) (Méndez-Lucio *et al.*, 2016).

### 1.3.3 Acoplamiento Molecular

En la actualidad, es posible obtener, con limitaciones, aproximaciones del reconocimiento e interacción molecular. En las computadoras modernas se pueden realizar acoplamientos básicos sin muchas dificultades y en una duración razonable. Este proceso se puede desarrollar de tres formas generales: acoplamiento rígido, flexible y covalente. El que se desarrolla en esta investigación que es una fusión entre el flexible y el rígido, donde el ligando se considera “libre” y desplazándose, mientras que el receptor permanece inmóvil. Esto permite un buen balance entre el tiempo de cálculo y la fiabilidad de los resultados. La búsqueda se realiza mediante un algoritmo que genera diferentes conformaciones del ligando en forma sistemática o estocástica (al azar) y las une con la proteína. Una vez determinadas las diferentes conformaciones del acoplamiento, el resultado es una diversidad de posiciones probables, donde han sido evaluadas por una función matemática que calcula la energía de cada conformación al interactuar con la proteína. Este valor de puntaje, constituye el criterio de selección del mejor acoplamiento, siendo la de menor energía (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019).

Este proceso, tiene algunos detalles. Para comenzar, la selección del modo de unión de menor energía como la correcta no es realista: en prácticamente ningún caso el ligando se encuentra en su conformación más estable cuando interactúa con una proteína. Otro problema actual es que hasta ahora no se ha desarrollado un algoritmo capaz de considerar en forma “natural” la flexibilidad y su influencia en el reconocimiento. A esto se añade, que en pocos casos se considera la contribución del agua durante la unión proteína-ligando, debido a que aún es

complicado modelar en forma rápida y precisa las moléculas del agua en forma explícita. Sin embargo, existen varias excepciones a la regla de forma que hay que conocer bien el sistema que se va a simular (Prieto-Martínez y Medina-Franco, 2019; Spyraakis y Cavasotto, 2015).

### 1.3.3.1 Interacciones intermoleculares

Para la selección del mejor modelo, se considera aquel que presente la mejor afinidad, esto es indicativo de que su actuación ocurre a menor concentración que otras moléculas. Cuando un ligando tiene el valor de la constante de disociación ( $K_i$ ) muy pequeño, indica que éste y su objetivo biológico se unen fuertemente. Los valores ideales de  $K_i$  están en el rango de la concentración nanomolar ( $1 \cdot 10^{-6}$ ). Por su parte los valores de  $K_i$  y la concentración inhibitoria media (IC50), están relacionados con la potencia de un inhibidor (Stevens, 2014).

El IC50 representa la concentración de un ligando requerida para una inhibición del objetivo biológico del 50% en pruebas *in vitro*. La afinidad que poseen los ligandos, está relacionada con la energía de enlace, que puede ser determinada a partir de la constante de equilibrio. El valor de esta constante permite calcular la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para la unión del complejo ligando-sitio activo como se muestra en la ecuación 1 (Meneses y Cuesta, 2015).

$$(1) \quad K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[E-I]}$$

La energía libre estándar ( $\Delta G^\circ$ ) de unión del complejo ligando-diana biológica, puede ser calculada utilizando la ecuación 2. Valores más negativos indican mayores energías de unión. La temperatura utilizada comúnmente es la de 298 K (25°C) (Meneses y Cuesta, 2015).

$$(2) \quad \Delta G^\circ = -2.3RT * \log\left(\frac{1}{K_i}\right) = 2.3RT * \log(K_i)$$

Los cambios de entalpía ( $\Delta H$ ) y de entropía ( $\Delta S$ ), deben ser considerados en la evaluación de la energía de unión como se muestra en la siguiente ecuación 3. Las interacciones intermoleculares que se son controladas por la entalpía, son los enlaces de hidrógeno formados entre el ligando y su diana molecular, mientras que efectos hidrofóbicos controlan los cambios en entropía (Stevens, 2014)

$$(3) \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

El término “interacción hidrofóbica” (o hidrófoba) alude a la tendencia de compuestos no polares a autoasociarse en un ambiente acuoso. Tal autoasociación no está impulsada por atracción mutua ni por lo que a veces es denominado de manera incorrecta como “enlaces hidrofóbicos”. La autoasociación minimiza la disrupción de interacciones desfavorables desde el punto de vista energético entre las moléculas de agua circundantes. Debido a que los hidrógenos no polares no forman enlaces de hidrógeno, afectan la estructura del agua que los rodea (Rodwell, 2015).

En el diseño de fármacos, el valor de  $\Delta G$  permite evaluar si la modificación de un medicamento aumenta o disminuye la afinidad con su objetivo biológico, estimando la estabilidad relativa de los diferentes compuestos. En síntesis, se puede utilizar para determinar si el sistema está en equilibrio, o qué tan rápido y en qué medida es probable que se dé la reacción de asociación (Stevens, 2014). La importancia descriptiva de  $\Delta G$ , hace que sea interesante determinar su valor mediante métodos computacionales (Meneses y Cuesta, 2015).

Cuando las moléculas no polares se mezclan con agua, rompen las interacciones energéticamente favorables de los enlaces de hidrógeno del agua. Los enlaces de hidrógeno que estabilizan las estructuras altamente ordenadas en forma de jaula alrededor de agrupamientos de moléculas no polares restringen el movimiento de las moléculas de agua, lo cual resulta en un decremento de la entropía. En consecuencia, la energía libre de las moléculas no polares que se disuelven es desfavorable (por ejemplo,  $\Delta G$  es positivo porque  $\Delta H$  es positivo y  $-T\Delta S$  es muy positivo). Sin embargo, el descenso de entropía es proporcional al área de contacto entre las moléculas no polares y el agua (Mckee y Mckee, 2014).

La agregación de moléculas no polares disminuye de forma significativa la superficie de contacto con el agua y, por lo tanto, el agua queda menos ordenada (por ejemplo, el cambio de entropía,  $\Delta S$ , es ahora positivo). Dado que  $-T\Delta S$  se hace negativo, la energía libre del proceso es negativa y, por lo tanto, procede de forma espontánea. La exclusión espontánea de grupos y moléculas hidrófobos por la interacción del agua con otras moléculas de agua o con grupos polares cercanos es un factor importante en procesos biológicos como el plegamiento de proteínas y el ensamblaje de estructuras supramoleculares como las membranas (Mckee y Mckee, 2014).

En los últimos años, es común expresar las energías de unión en términos de eficiencia del ligando (LE, por sus siglas en inglés *efficiency ligand*). La eficiencia del ligando y propiedades termodinámicas constitutivas del  $\Delta G$  ( $\Delta H$  y  $\Delta S$ ), pueden proporcionar información sobre la unión de una molécula con su ligando, que van más allá de simples comparaciones de potencia inhibitoria (Meneses y Cuesta, 2015; Reynolds y Holloway, 2011). LE es una medida que relaciona la energía libre de unión con el tamaño de la molécula. Es importante examinar cómo cambian los valores de LE a medida que se realizan cambios en diferentes partes de la molécula. LE se obtiene de dividir la energía libre de unión de cada molécula por el número de átomos ( $n$ ) no hidrógenos presentes en la estructura (ecuación 4) (Meneses y Cuesta, 2015; Murray *et al.*, 2014):

$$(4) \quad LE = \frac{\Delta G}{n}$$

La eficiencia de ligando es bastante dependiente del tamaño de la molécula donde ligandos de menor peso molecular van a tener mejores eficiencias en promedio que ligandos más grandes. La principal causa para esto es que a medida que el ligando crece en tamaño se reduce la calidad de la unión entre este y el receptor, ya que ligandos más grandes y complejos dificultan la entrada hasta el sitio activo del receptor (Reynolds y Holloway, 2011).

Los descriptores de afinidad tienen varias limitaciones. En primer lugar, todos los átomos que no son hidrógeno tienen el mismo peso, por lo que la introducción de un CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, OH, F, Cl, Br creará el mismo cambio en valores de LE, sin tomar en cuenta las ventajas y desventajas de introducir moléculas polares o especies cargadas en la molécula. Esto supone un riesgo en la utilización de LE, sin considerar otras propiedades tales como la potencia, eficiencia lipofílica del ligando (LLE, por sus siglas en inglés *lipophilic ligand efficiency*), solubilidad, farmacocinética, entre otros (Murray *et al.*, 2014).

Algunos autores sugieren que existen mejores indicadores de eficiencia del ligando, como son el índice porcentual o eficiencia-potencia (PEI, por sus siglas en inglés *percentage/potency efficiency index*), el índice de eficiencia de unión (BEI, por sus siglas en inglés *binding efficiency index*), porque son más fáciles de calcular y tienen en cuenta las diferencias entre los elementos en diferentes filas de la tabla periódica (Abad-Zapatero y Metz, 2005). La eficiencia del ligando lipofílico (LLE), por otro lado, es un parámetro extremadamente importante que se debe tomar en cuenta durante la optimización de compuestos. LLE considera explícitamente el equilibrio entre la lipofilia y la potencia inhibitoria. Sin embargo, a pesar de sus puntos fuertes, LLE no es tan idóneo cuando se quiere comparar moléculas de diferentes tamaños. También, LLE no es útil cuando el objetivo biológico requiere moléculas muy polares (Murray *et al.*, 2014).

No existe un descriptor de afinidad que sea la solución a todos los problemas y que conduzca al éxito. Sin embargo, el concepto de LE es importante en investigaciones, para guiar las estrategias basadas en los fragmentos, para acelerar el descubrimiento de fármacos y en la toma de decisiones (Murray *et al.*, 2014).

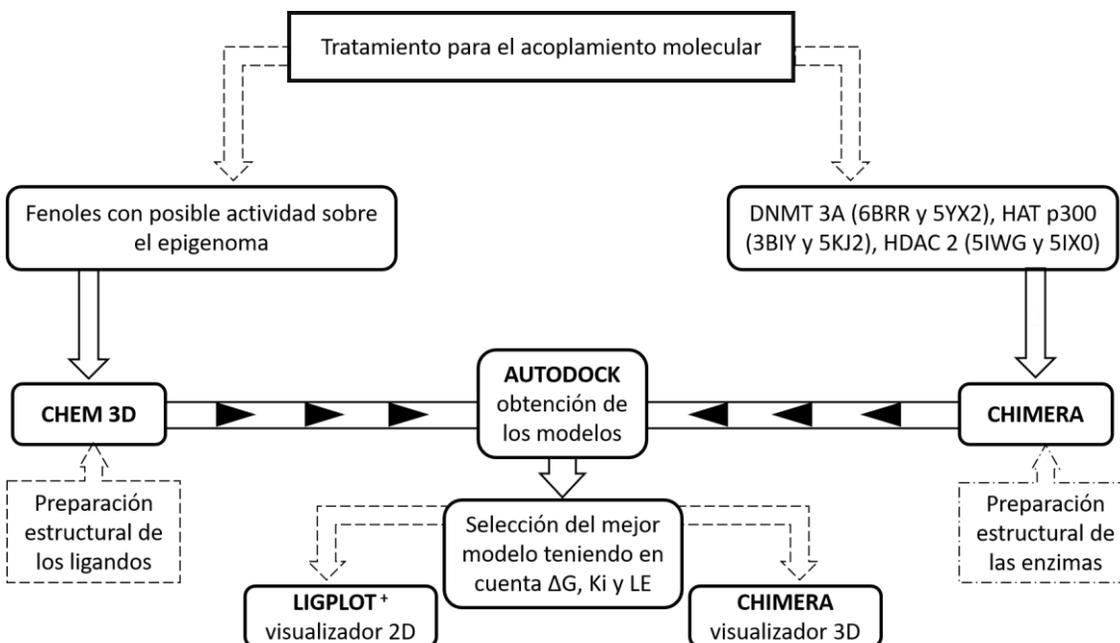
La aplicación de los principales resultados en el presente capítulo anunciados con los abordajes *in silico* en los estudios de acoplamiento molecular, revisten particular interés para la exploración predictiva de la actividad moduladora de eventos epigenéticos por compuestos fenólicos presentes en las setas comestibles con potencial aplicación en las estrategias quimiopreventivas contra el cáncer.

## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Diseño del experimento y herramientas informáticas

La investigación se desarrolló en los sistemas operativos Windows y Linux. En Windows se utilizaron los programas Chem 3D del paquete ChemOffice 2015 (ChemOffice) , para obtener la estructura de los ligandos en *.pdb* a partir de su código SMILE y la optimización de las geometrías moleculares. AutoDock Tools 1.5.6 (Morris *et al.*, 2009) y Chimera 1.13.1 (Pettersen *et al.*, 2004) se emplearon para la preparación y ajuste del ligando y la enzima para la realización de los cálculos además de su posterior visualización en 3D de los resultados. LigPlot+ 1.4.5 (Wallace *et al.*, 1995) se utilizó para la visualización en 2D. Todos los cálculos del acoplamiento se realizaron en el clúster de la Universidad de Oriente, montado en el sistema operativo Linux.

La metodología general empleada en la investigación se resume en el siguiente esquema:



En trabajos previos de nuestro grupo, se realizó la comparación entre los compuestos fenólicos derivados de setas comestibles, de los cuales no se conocía su actividad sobre el epigenoma, y compuestos con actividad conocida sobre las enzimas: desacetilasa de histonas (HDAC), acetiltransferasa de histonas (HAT) y metiltransferasa de ADN (DNMT). Se obtuvieron un total de 13 compuestos con similitud estructural ( $>0.8$ ) de 25 con posible actividad sobre el epigenoma Tabla 2 (Aguirre *et al.*, 2018). El cribado se realizó utilizando el programa bioinformático SARANEA v1.0 (Lounkine *et al.*, 2010), que utiliza para la cuantificación de la similitud estructural una relación matemática conocida como Coeficiente de Tanimoto (figura 4).

La metodología del acoplamiento molecular consta de una serie de etapas; la primera consiste en tener una serie de ligandos potenciales con estructura tridimensional conocida; la segunda en disponer de la estructura tridimensional de la molécula blanco; y la tercera etapa consiste en un algoritmo de computadora que toma cada uno de los ligandos y los hace interaccionar con la molécula blanco en el sitio de unión previamente escogido por el usuario.

## 2.2 Representación y optimización de la geometría de los fenoles

Como primera etapa, se seleccionaron los 13 fenoles (tabla 2) que tuvieron similitud estructural frente a los compuestos con actividad sobre las enzimas DNMT, HAT y HDAC en trabajos precedentes (Aguirre *et al.*, 2018). Primeramente se procedió a la preparación de los ligandos, los que se importaron en el programa Chem 3D del paquete ChemOffice 2015. Se procedió a continuación, al ajuste del ligando al mínimo de energía empleando como modelo matemático el método de cálculo semiempírico AM1. Luego se exportó como fichero *.pdb* para utilizarlo posteriormente en el programa Chimera y cambiar el formato a *.pdbqt*, necesario para realizar el acoplamiento.

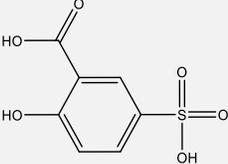
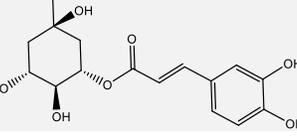
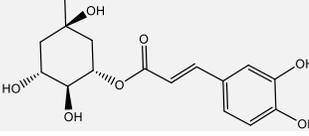
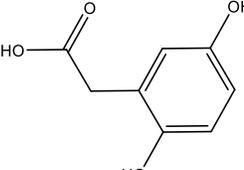
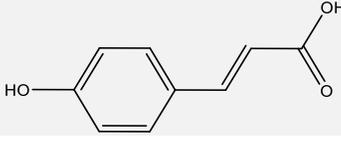
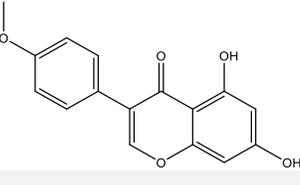
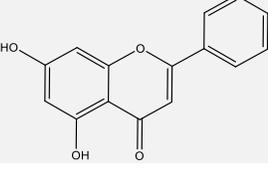
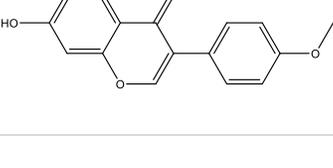
## 2.3 Representación y optimización de las enzimas

En la segunda etapa, se seleccionaron las estructuras de las enzimas de este estudio que fueron descargadas de la base de datos internacional Protein Data Bank (PDB) (Banco de Datos de Proteínas). Esta base de datos posee estructuras tridimensionales de las proteínas y ácidos nucleicos, obtenidos generalmente mediante cristalografía de rayos-x. Las estructuras de las enzimas descargadas fueron (tabla 3):

- ADN metiltransferasas: la DNMT3A – DNMT3L en complejo con ADN de 25-meros depositado con el código de acceso (ca) 6BRR y la DNMT3A (R836A mutado) –DNMT3L en complejo con ADN de 25-meros ca: 5XY2 (Zhang *et al.*, 2018).
- Acetiltransferasas de histona (HAT): complejo p300 HAT-Lys-CoA 3BIY y el complejo p300/CBP A-845 ca: 5KJ2 (Lasko *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2008)
- Desacetilasa de histona HDAC (HDAC2): con el ligando BRD4884 ca: 5IWG y con el ligando BRD7232 ca: 5IX0 (tabla 3) (Wagner *et al.*, 2016)

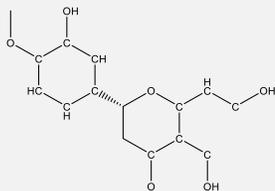
Estas estructuras cristalizadas de enzimas descargadas en *.pdb* se les tomó las coordenadas del centro activo en Autodock tool a partir del inhibidor que este ya contenía (Tabla 4). Luego utilizando el Chimera se procedió a la eliminación de todos los residuos de la enzima que no pertenecían a su estructura primaria. Posteriormente, se guardó en fichero *.pdb* para su tratamiento en Autodock tool. Una vez importada la enzima, se procedió a su estabilización a través de las cargas Kollman, permitiendo que la enzima esté en un estado *zwitterión*, se añadieron los hidrógenos polares y se les asignó el tipo de átomo AD4 (AutoDock 4). Por último, se exportaron las enzimas en el formato *.pdbqt* que contiene todos los datos necesarios de su estructura para el acoplamiento (Velásquez *et al.*, 2013).

Tabla 2: Estructura de los fenoles derivados de setas comestibles empleados en el estudio

	FENOLES	ESTRUCTURA EN 2D	CÓDIGO SMILE
1	Ácido 5-sulfosalicílico		<chem>C1=CC(=C(C=C1S(=O)(=O)O)C(=O)O)O</chem>
2	Ácido cafeico		<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)O)O</chem>
3	Ácido clorogénico		<chem>C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O</chem>
4	Ácido homogentísico		<chem>C1=CC(=C(C=C1O)CC(=O)O)O</chem>
5	Ácido p-cumárico		<chem>c1(ccc(O)cc1)\C=C\C(O)=O</chem>
6	Biocanina A		<chem>COC1=CC=C(C=C1)C2=COC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)O</chem>
7	Crisina		<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>
8	Formononetina		<chem>COC1=CC=C(C=C1)C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O</chem>

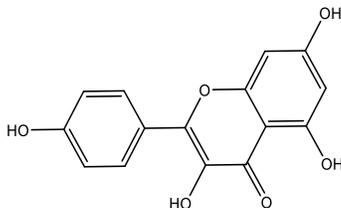
9

Hesperetina


COC1=C(C=C(C=C1)C2CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O

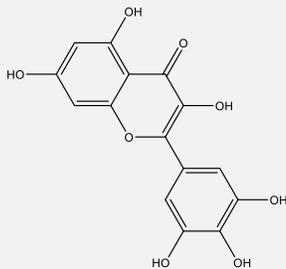
10

Kaempferol


C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O

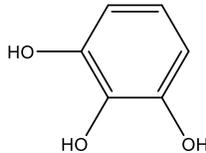
11

Miricetina


C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O

12

Pirogalol


C1=CC(=C(C(=C1)O)O)O

13

Quercetina

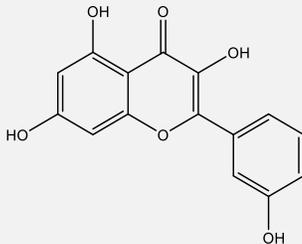

C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O

Tabla 3: Enzimas empleadas en esta investigación que participan en los eventos epigenéticos visualizadas en 3D con el programa bioinformático Chimera

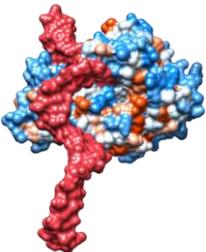
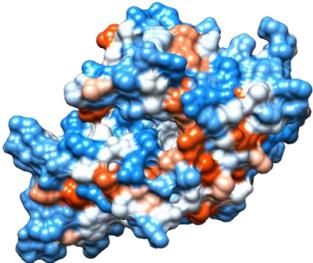
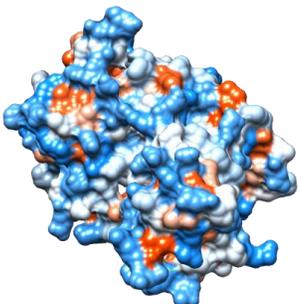
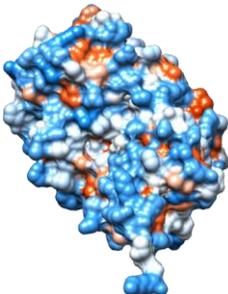
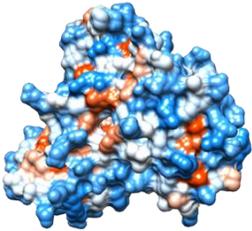
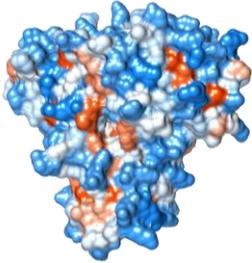
Metiltransferasa de ADN: DNMT3L	
6BRR 	5XY2 
Acetiltransferasa de Histona HAT	
3BIY 	5KJ2 
Desacetilasa de Histona HDAC	
5IWG 	5IX0 

Tabla 4: Configuración de la caja enrejada (grid box) para el acoplamiento molecular

Proteínas	Coordenadas			Espaciado	Tamaño
	X	Y	Z		
DNMT 5YX2	47.0	-7.115	-9.205	0.375	44x40x40
DNMT 6BRR	-3.005	-71.136	12.774	0.375	42x42x42
HAT 3BIY	-15.657	19.599	2.091	0.375	40x56x40
HAT 5KJ2	33.615	8.151	183.814	0.375	40x40x48
HDAC 5IWG	87.846	46.808	-33.335	0.375	40x42x42
HDAC 5IX0	64.488	29.139	1.478	0.375	40x40x40

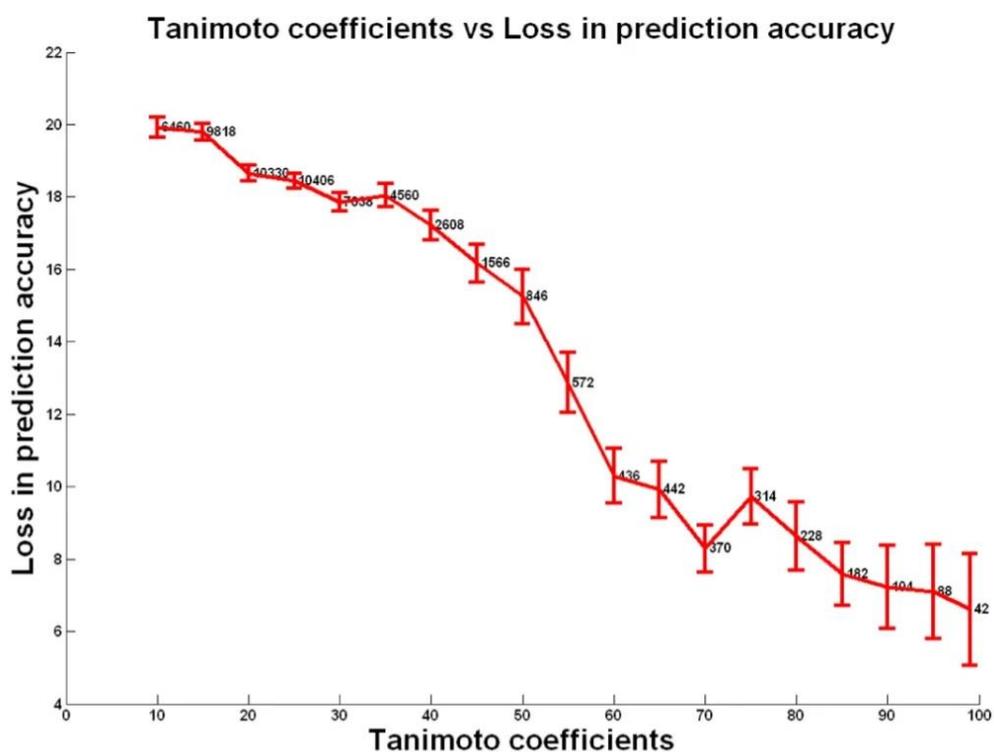


Figura 4. Coeficiente de Tanimoto frente a la pérdida en la confiabilidad en la predicción Shivakumar y Krauthammer (2009)

## 2.4 Configuración del acoplamiento molecular

Como última etapa, luego de preparado las enzimas y sus ligandos, se procedió a la configuración del acoplamiento utilizando el programa *AutoDock*, para definir los parámetros del acoplamiento. Para ello, es necesario la obtención de dos ficheros, el *gpf* y el *dpf*. El *gpf* (fichero *grid*) contiene la información referida a la posición donde se desarrollará el acoplamiento tabla (4), de este se derivan los diferentes tipos de mapas, la localización y alcance de dichos mapas y la especificidad *pair-wise* de los parámetros de energía potencial. En general, un mapa contiene el cálculo por cada elemento en el ligando, más un mapa electrostático. Los parámetros de los archivos denominados "*autogrid*" de la caja enrejada contienen los tipos de mapas a calcular, la ubicación y la extensión de dichos mapas y especifica los parámetros de energía potencial por pares. (Huey y Morris, 2008).

Para obtener el fichero con extensión *gpf* haciendo uso del programa *AutoDockTools* version 1.5.6, se cargan el ligando y la proteína con extensión *pdbqt*, utilizando las coordenadas obtenidas previamente para definir la región donde se desarrollará el acoplamiento molecular, luego de realizar esto, se procede al guardado del fichero con extensión *gpf*. El fichero *dpf* se obtiene seleccionando la enzima y el ligando que se acoplarán para definir el algoritmo parámetro del acoplamiento. Primeramente se definió como parámetro de búsqueda el Algoritmo Genético (GA); en este se define el un número de modelos para el acoplamiento en el que se escogieron 100 dejando los otros parámetros por defecto. Por último se seleccionó como algoritmo del acoplamiento el Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA); guardando el fichero en formato *dpf*.

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los polifenoles son los grupos de fitoquímicos más importantes presentes en plantas y hongos. Estos compuestos exhiben roles biológicos en células humanas actuando como antioxidantes, detoxificantes, estimulantes del sistema inmunitario, modulación del metabolismo hormonal y como agentes antitumorales. Investigaciones de años recientes evidencian el rol de los polifenoles como importantes moléculas que protegen las células de daños al ADN. Debido a esto, tienen importantes beneficios en la prevención y tratamientos de enfermedades oncológicas. Actualmente, los principales estudios en células cancerígenas se realizan con ácidos fenólicos y flavonoides (Carlos-Reyes *et al.*, 2019).

Los polifenoles constituyen un componente esencial de la dieta humana, siendo los flavonoides y los ácidos fenólicos los más comunes en los alimentos. No es sorprendente que haya una creciente comprensión de que la menor incidencia de cáncer en ciertas poblaciones probablemente se deba al consumo de ciertos nutrientes, y especialmente a las dietas ricas en polifenoles. En consecuencia, una disección sistemática del potencial quimiopreventivo de los compuestos polifenólicos en los últimos años ha respaldado claramente sus beneficios para la salud, incluidas las propiedades anticancerígenas (Link *et al.*, 2010).

Se han logrado avances significativos en la comprensión de los mecanismos moleculares que sustentan los efectos quimiopreventivos de los polifenoles y, en consecuencia, se ha identificado una amplia gama de mecanismos y dianas genéticas para compuestos individuales. Varias explicaciones acerca del mecanismo de su eficacia quimiopreventiva incluyen su capacidad para interrumpir o revertir el proceso de carcinogénesis actuando sobre las moléculas de la red de señalización intracelular involucradas en el iniciación y / o promoción del cáncer, o su potencial para detener o revertir la etapa de progresión del cáncer (Link *et al.*, 2010).

### 3.1 Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos con la enzima ADN metiltransferasa (DNMT)

La metilación del ADN tiene lugar en citosinas seguidas de guaninas (dinucleótidos CpG), localizado principalmente en islas CpG, abundante en los lugares de regulación y regiones promotoras de los genes. La metilación de estas regiones hace que su cromatina se condense, convirtiéndose en heterocromatina, donde los factores de transcripción tienen un difícil acceso llevando a su silenciamiento (Hodges *et al.*, 2011).

La enzima, ADN (cytosine-5)-metiltransferasa 3A, es requerida para la metilación de novo en todo el genoma y es esencial para el establecimiento de modelos de metilación del ADN durante el desarrollo (tabla 3). Esta se encuentra coordinada con la metilación de histonas. Este proceso modifica el ADN de manera no procesiva y también modifica los sitios no CpG. Preferentemente, el ADN metilado puede unirse entre dos núcleos nucleosomales y estar inhibida por la histona H1. Actúa como un correpressor transcripcional para el gen ZBTB18. Reclutado para el trimetilado de los sitios 'Lisina-36' de la histona H3 (H3K36me3). Puede reprimir

activamente la transcripción a través del reclutamiento de la actividad de la enzima HDAC UniProtKB-Q9Y6K1 (DNM3A\_HUMAN). (22/10/2019). Obtenido de <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y6K1>.

La metilación del ADN es un marcador de alta dinámica de gran importancia en los procesos de desarrollo. Específicamente, los modelos de metilación están fuertemente perturbado por enfermedades, fundamentalmente en el cáncer (Sipl *et al.*, 2019).

Algunas moléculas como los polifenoles poseen la habilidad de modificar la actividad de las enzimas que actúan en el marcaje epigenético. Muchos estudios reportan la capacidad de inhibir la metilación del ADN y otros mecanismos epigenéticos o la propiedad de cambiar la disponibilidad de sustrato necesaria para esas enzimas. Por este mecanismo, muchos polifenoles juegan un papel significativo en la prevención de diferentes enfermedades como el cáncer, las neurodegenerativas, inflamatorias y metabólicas. (Russo *et al.*, 2017)

En la tabla 4 se resumen las variables evaluadas: energía libre, constante de inhibición y eficiencia del ligando entre los mejores modelos de los ligandos con las enzimas ADN metiltransferasas 5YX2 y 6BRR. La isoflavona **biocanina A**, ha sido identificada como agente anticancerígeno y su efecto se ha visto potenciado en ensayos combinándolo con otros fenoles. Las células LNCaP, DU-14 y PC-3 de cáncer de próstata fueron sometidas a tratamientos con genisteína, quercetina y biocanina A. Como resultado, esta combinación demostró el efecto inhibitorio de las tirosinas quinasas y también de los receptores de aril-hidrocarburo (ArH) humanos activados inhibiendo así la carcinogénesis prostática. La combinación de estos, causó la disminución del desarrollo del cáncer de próstata en dosis de 8.33  $\mu\text{M}$  + 8.33  $\mu\text{M}$  + 8.33  $\mu\text{M}$  respectivamente favoreciendo el incremento de la actividad de las enzimas BAX / BCL-2, la actividad caspasa-3, la actividad ER- $\beta$ , la actividad de p-JNK y la apoptosis. Disminuyó además la actividad de las enzimas p-ERK, la actividad de PCNA, la proliferación celular (Arora *et al.*, 2019).

También se ha reconocido como un inhibidor de la DNMT y la HDAC en cáncer de próstata y esófago a concentraciones de 20-100  $\mu\text{M}$  (Link *et al.*, 2010). Asimismo, ha mostrado inhibición de la metilación del gen RAR $\beta$  en el modelo celular KYSE 510 en concentraciones de 5-20  $\mu\text{M}$  (Gilbert y Liu, 2010). <sup>Kcal/mol</sup>

El mejor modelo del acoplamiento entre la biocanina A con la enzima 5YX2 muestra valores de interacción relativamente fuerte teniendo en cuenta la figura 3, con una energía de unión de -9.50 <sup>Kcal/mol</sup>, constante de inhibición de 192.3nM. La eficiencia del ligando de -0.45 se encuentra dentro del rango óptimo según Meneses y Cuesta (2015). Mientras que los valores de los modelos obtenidos con la enzima 6BRR fueron ligeramente diferentes, con energía libre de -8.97 <sup>Kcal/mol</sup>, constante de inhibición de 264.8nM y eficiencia del ligando de 0.43. Lo que indica que a pesar de las diferencias estructurales entre estas enzimas, los resultados fueron similares.

El ácido clorogénico pertenece al grupo de compuestos fenólicos denominados ácidos hidroxicinnámicos. Se ha evaluado su actividad moduladora sobre eventos

epigenéticos en estudios *in vitro* e *in silico* su actividad sobre la enzima HDAC8 con energía de enlace de  $-9.37 \text{ Kcal/mol}$  y una constante de inhibición de 135nM (Bora-Tatar *et al.*, 2009). Además se ha identificado como un inhibidor de la metilación del ADN en la región del promotor del gen RAR $\beta$  en las líneas celulares de cáncer de pecho MCF7 y MDA-MB-231 (Paluszczak *et al.*, 2010; Schnekenburger *et al.*, 2014).

El mejor modelo del acoplamiento molecular entre este ligando y la enzima 5YX2 reflejó altos valores de interacción, la energía libre fue de  $-9.37 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de 112.8nM y enlace del ligando de -0.38, sin embargo, con la enzima 6BRR el mejor modelo fue ligeramente diferente con valores de energía libre de  $-8.10 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de 1.16 $\mu$ M y eficiencia de enlace de -0.32. Todos los valores obtenidos están dentro de los rangos aceptables según la figura 3, pero en la eficiencia del ligando con la enzima 6BRR está por debajo de los mejores candidatos a fármaco, esto no lo limita a cumplir sus funciones biológicas. Este índice es inversamente proporcional al tamaño molecular, lo que ayuda a controlar el tamaño molecular durante la optimización (Meneses y Cuesta, 2015).

La flavona **crisina** es capaz de bloquear la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis. Aunque ha sido identificada como un inhibidor de la HDAC y HMT, mediante estudios *in silico* e *in vitro* (Kanwal *et al.*, 2016). Aún no se han hecho estudios con la enzima DNMT.

El mejor modelo del acoplamiento entre este polifenol y la enzima 5YX2, mostro valores de interacción relativamente fuertes en los parámetros evaluados. La energía libre fue de  $-9.65 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de 85.1nM, la eficiencia del ligando de -0.51. Este último parámetro evaluado si bien no justifica que se efectuó el acoplamiento, si indica que posee altas probabilidades de presentar una respuesta biológica por la unión al receptor de destino y la magnitud cuantitativa, debido a que su tamaño molecular tendría más acceso al sitio activo de la enzima. Sin embargo, el mejor modelo con la enzima 6BRR resulto ligeramente diferente con una energía libre de  $-8.98 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de 261.1 y eficiencia del ligando de -0.47.

Por otra parte, la isoflavona **formononetina** ha sido identificada como un regulador de mecanismos epigenéticos, En experimentos actúa como activador del gen SIRT1 y de la DNMT, presumiblemente debido a la presencia de un grupo OH en la posición 7 (Ayissi *et al.*, 2014).

El mejor modelo del acoplamiento entre esta isoflavona y la enzima 5YX2, evidenció una interacción relativamente fuerte según la figura 3, con una energía libre de  $-9.11 \text{ Kcal/mol}$ , una constante de inhibición de 210.2 nM y eficiencia del ligando de -0.46. Mientras que el mejor modelo obtenido con la enzima 6BRR, resultaron ser discretamente mejores, energía libre de  $-9.29 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de 155.2nM y -0.46 de eficiencia del ligando. Ello indica que a pesar de las diferencias estructurales entre estas enzimas, es posible que se efectúe en ambos el acoplamiento.

El isoflavonoide **hesperetina** se ha reconocido por presentar efectos antidiabéticos, antioxidante y anticancerígeno. La actividad epigenética de la hesperetina fue evaluada en células de carcinoma KYSE-510 incubadas por cinco horas de 20 a 50  $\mu\text{mol/L}$ . Sin especificar la actividad de la DNMTi para isoformas particulares, se obtuvo que la hesperetina era un inhibidor más potente que la naringenina en dicha prueba (Busch *et al.*, 2015; Carlos-Reyes *et al.*, 2019; Tripathi, 2018).

El mejor modelo del acoplamiento entre este polifenol y la enzima 5YX2 evidenció la interacción más fuerte entre todos los ligandos empleados con la enzima DNMT en cuanto a los parámetros de energía libre y constante de inhibición,  $-10.01 \text{ Kcal/mol}$  y  $45.6 \text{ nM}$ , respectivamente. La eficiencia del ligando aunque no fue el valor más promisorio, se hallaba dentro del rango según Meneses y Cuesta (2015). Sin embargo, el mejor modelo formado con la enzima 6BRR fue moderadamente diferente, la energía de unión fue de  $-9.03 \text{ Kcal/mol}$ , la constante de inhibición de  $242 \text{ nM}$  y la eficiencia del ligando de  $-0.41$ .

El polifenol **kaempferol** junto a la crisina y la quercetina, han demostrado su capacidad de inhibir el TNF- $\alpha$  potenciando la activación y expresión del promotor IL-8 en células HEK293. Además la degradación y fosforilación de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , la translocación del complejo proteico NF- $\kappa$ B p65 que controla la transcripción del ADN, fueron bloqueados por estos flavonoides en las células HEK293 activadas por el TNF- $\alpha$  (Abdul *et al.*, 2017).

El mejor modelo obtenido del acoplamiento con este polifenol con la enzima 5YX2, exhibió valores relativamente altos de interacción, energía libre de unión de  $-9.54 \text{ Kcal/mol}$  y constante de inhibición de  $101.4 \text{ nM}$ , y eficiencia del ligando de  $-0.45$ . Mientras que el mejor modelo de acoplamiento entre este ligando con la enzima 6BRR, exhibió valores de interacción moderadamente más bajos, con  $-8.09 \text{ Kcal/mol}$  de energía libre, constante de inhibición de  $1.2 \mu\text{M}$  y  $-0.38$  de eficiencia del ligando, siendo este último valor, el más bajo del acoplamiento molecular realizado con ambas enzimas. En este caso, a diferencia de los anteriores, las diferencias estructurales entre estas enzimas, se marcó más en el resultado. No obstante, estos resultados estuvieron dentro de los rangos aceptados, la fuerza de interacción evaluada por los parámetros de energía libre y constante de inhibición resultaron ser relativamente fuertes, lo que evidencia su posible actividad. Debido a que en los estudios *in silico* aún no es posible evaluar todas las variables existentes en una interacción ligando-diana biológica, como los valores fármaco-cinéticos, modelado eficiente de las moléculas de agua, ello hace necesarios realizar estudios *in vitro* que permitan confirmar dichos resultados.

Investigaciones actuales indican que la acción de la DNMT resulta interrumpida por la acción del compuesto EGCG en células de cáncer de colon humano por la unión al sitio activo de la enzima. La **miricetina** (con un residuo de pirogalol estructuralmente similar a un residuo gálico de EGCG) inhibió significativamente la DNMT1 humana y la DNMT1 de procariotas (Jasek *et al.*, 2019).

El mejor modelo del acoplamiento de este ligando con la enzima 5YX2 evidenció una energía libre de  $-9.54 \text{ Kcal/mol}$ , con una constante de inhibición de  $101.6 \text{ nM}$  y eficiencia del ligando de  $-0.45$ , evidenciando su posible actividad sobre esta enzima.

Mientras que el mejor modelo obtenido con la enzima 6BRR, presentó valores notablemente diferentes, con una energía libre de  $-8.09 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $2.17 \mu\text{M}$  y una eficiencia del ligando de  $-0.37$ , esto ocurre debido a las pequeñas diferencias estructurales entre estas enzimas y otras características que estaban involucradas en la cristalización que no son modeladas en este estudio como el solvente, pH entre otras.

El polifenol **pirogalol** resulto ser, de todos los modelos obtenidos para las dos enzimas, el que menor energía libre de unión obtuvo. Con la enzima 5YX2, la energía libre fue de  $-5.37 \text{ Kcal/mol}$  y en consecuencia una constante de inhibición de  $115.2 \mu\text{M}$ , mientras que la eficiencia del ligando mostro el mayor valor del estudio con  $-0.60$ , como consecuencia del tamaño molecular del pirogalol. Con la enzima 6BRR los valores del mejor modelo fueron discretamente mejores, con una energía libre de  $-5.52 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $90.3 \mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.61$ .

A pesar de los problemas de este índice, la eficiencia del ligando (EL) es la capacidad del ligando para producir una respuesta biológica al unirse al receptor de destino y la magnitud cuantitativa de esta respuesta. Sin embargo, un alto índice de eficiencia del ligando o de energía libre, no son suficientes para afirmar que será el mejor ligando inhibidor ya que la influencia que tienen otras propiedades farmacocinéticas, como la vida media del medicamento, puede favorecer a otros que posean valores de estos índices más bajos como es el caso del meloxicam y el ibuprofeno (Meneses y Cuesta, 2015). No obstante, a pesar de que el pirogalol ostenta el valor más débil de energía libre de unión en comparación con los demás ligandos evaluados, este no se debería despreciar, ya que existen medicamentos que poseen energías semejantes además de que se encuentra dentro del rango según la figura 3.

El flavonoide **quercetina** ha sido reconocido por su actividad antioxidante. Los ensayos realizados por transferencia Western y PCR específicos de metilación, revelaron que el tratamiento con quercetina eliminó casi por completo la expresión tanto de DNMT1 como de DNMT3A. Además, el ensayo específico de metilación (MSP) después de la PCR semicuantitativa demostró que, en comparación con el tratamiento con DMSO, el tratamiento con quercetina disminuyó ligeramente la metilación en la región de flujo ascendente (upstream) del promotor EBV F / Q (M. Lee *et al.*, 2015). En un estudio *in silico* e *in vitro*, la quercetina modificó metilación de promotores 5' CpG y reactivó genes supresores de varios tumores por modulación de marcas epigenéticas en células de cáncer de cuello de útero (Kedhari Sundaram *et al.*, 2019).

El mejor modelo resultante del acoplamiento de este polifenol con la enzima 5YX2, evidenció valores de interacción relativamente fuertes, energía libre y de constante de inhibición,  $-9.38 \text{ Kcal/mol}$  y  $132.9 \text{ nM}$  respectivamente según la figura 3. La Eficiencia del ligando de  $-0.43$  se encuentra dentro del rango favorable, lo que indica una mayor probabilidad de que se produzca el acoplamiento debido al tamaño molecular del ligando. Mientras que el mejor modelo resultante del acoplamiento entre la enzima 6BRR, evidenció valores más bajos debido a las diferencias estructurales entre estas enzimas. La energía libre de unión fue de  $-8.54 \text{ Kcal/mol}$ , la

constante de inhibición de 551.8 nM y -0.39 de eficiencia del ligando. Estos resultados, a pesar de ser discretamente diferentes, se encuentra dentro del rango de compuestos líderes.

En la tabla 5 se resumen los resultados del acoplamiento atendiendo a tres parámetros: energía libre, constante de inhibición y el índice de eficiencia del ligando. En las tablas 6 y 7 se muestran las interacciones hidrofóbicas más frecuentes entre los aminoácidos con cada modelo de ligando escogido. En la figura 5 se encuentra el ligando de referencia con su enzima (5YX2) en 2D y 3D, mientras que en la figura 6 se agrupan todos los ligandos incluido el de referencia, permitiendo apreciar las posiciones de los ligandos en el acoplamiento molecular con respecto al de referencia. En las figuras 7-15 se observan las interacciones hidrofóbicas y de enlace de hidrógeno establecidas entre los ligandos y la enzima 5YX2.

De los aminoácidos que tuvieron mayor frecuencia de interacción entre los ligandos y la enzima 5YX2 fueron: Fenilalanina (640), Serina (892), Triptófano (893), Serina (708), Glicina (707), Ácido aspártico (641), Isoleucina (705), Arginina (891), Glicina (706), Alanina (644), Prolina (709) y Cisteína (710). Es posible que estas regiones donde suelen formarse estas interacciones hidrofóbicas sean claves para efectuar la interacción entre la enzima y el ligando.

Mientras que con la enzima 6BRR, existieron menos frecuencias de interacciones con respecto a la enzima 5YX2, siendo los más usuales: Serina (892), Fenilalanina (640), Ácido Aspártico (641), Glicina (642), Triptófano (893), Prolina (709), Glicina (707), Arginina (891). Es posible que esto se deba a las diferencias estructurales entre estas enzimas, que si bien no son grandes, es suficiente para modificar estas interacciones.

Sin embargo al comparar estas interacciones con las del ligando de referencia de ambas enzimas (figura 5, 6), se pudo observar que existían algunas coincidencias. En el caso de la enzima 5YX2, como se muestra en la tabla 6, siete aminoácidos coincidieron, excepto la Glicina (642), todos ellos se encontraron con gran frecuencia. En el caso del triptófano (893) y treonina (645) fueron interacciones por enlace de hidrógeno en el ligando de referencia; es posible que esto se deba a la naturaleza química de este ligando que difiere de los fenoles seleccionados.

En el caso de la enzima 6BRR (tabla 7), existieron mayor cantidad de coincidencias con el ligando de referencia con respecto a la enzima 5YX2 con 14 aminoácidos, de ellos, solo cinco estaban presentes solo en dos ligandos, cuatro con el ácido clorogénico y uno con la biocanina A. En el caso del Triptófano (893), Ácido glutámico y Treonina fueron interacciones por enlace de hidrógeno en el ligando de referencia.

Las frecuencias de las interacciones establecidas por enlace de hidrógeno entre los ligandos y las dos enzimas DNMT utilizadas, se muestran en las tablas 8 y 9. Los enlaces de hidrógeno determinan la entalpía del sistema, lo que conlleva a la

estabilización de la interacción ligando-enzima. Entre los aminoácidos más frecuentes que formaron este enlace en la enzima 5YX2 fueron: treonina (645), Glicina (646) y Leucina (639), con el ligando de referencia coincidieron siete aminoácidos, de ellos tres fueron interacciones hidrofóbicas, la Arginina (891), el Ácido aspártico y la Glicina (707).

En la enzima 6BRR, los enlaces de hidrógeno más frecuentes en los mejores modelos de los ligandos utilizados fueron: treonina (645) y Cisteína (710) e Isoleucina (643). De los 14 aminoácidos que establecieron enlaces de hidrogeno con sus ligandos, solo coincidieron ocho con el de referencia, de ellos, cuatro fueron interacciones hidrofóbicas, Arginina (891), Ácido aspártico (641), Glicina (707) y Fenilalanina (640). Esto se debe probablemente a las diferencias en la naturaleza química de los ligandos utilizados y el de referencia, además esta investigación no tiene en cuenta el solvente debido a las complejidades de su modelación, por lo que este sería también un factor de gran importancia a tener en cuenta.

Tabla 5: Parámetros evaluados en el acoplamiento entre los mejores modelos de cada ligando con las enzimas ADN metiltransferasas 5YX2 y 6BRR

Ligando	Tc	ADN metiltransferasa 5YX2			ADN metiltransferasa 6BRR		
		$\Delta G$ <i>Kcal/mol</i>	Ki	LE kcal/mol/ atom	$\Delta G$ <i>Kcal/mol</i>	Ki	LE kcal/mol/ atom
Biocanina A C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	1	-9.50	192.3 nM	-0.45	-8.97	264.8 nM	-0.43
Ácido clorogénico C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	0.87	-9.48	112.8 nM	-0.38	-8.10	1.16 μM	-0.32
Crisina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	0.86	-9.65	85.1 nM	-0.51	-8.98	261.1 nM	-0.47
Formononetina C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	0.89	-9.11	210.2 nM	-0.46	-9.29	155.2 nM	-0.46
Hesperetina C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0.91	-10.01	45.6 nM	-0.46	-9.03	242 nM	0.41
Kaempferol C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	0.86	-9.54	101.4 nM	-0.45	-8.09	1.2 μM	-0.38
Miricetina C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	1	-9.46	115.6 nM	-0.47	-7.73	2.17 uM	-0.37
Pirogalol C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	0.88	-5.37	115.2 μM	-0.60	-5.52	90.3 μM	-0.61
Quercetina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0.86	-9.38	132.9 nM	-0.43	-8.54	551.8 nM	-0.39

Tabla 6: Ligandos agrupados por las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de la enzima DNMT 5YX2, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia, de color verde los que coincide con otra interacción y de color negro los que no coinciden

Aminoácidos	Total	Ligandos
Phe-640	9	Todos
Ser-892 y Trp-893	8	Clorogénico, Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Pirogalol, Quercetina
Ser-708 y Gly-707	7	Biocanina, Clorogénico, Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Asp-641	7	Biocanina, Clorogénico, Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaempferol, Quercetina
Ile-705	7	Biocanina, Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Arg-891	6	Biocanina, Clorogénico, Crisina, Formononetina, Hesperetina, Pirogalol
Gly-706	6	Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Ala-644	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Pro-709	5	Biocanina, Clorogénico, Formononetina, Kaempferol, Miricetina
Cys-710	5	Clorogénico, Formononetina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina
Glu-756	4	Crisina, Formononetina, Kaempferol, Miricetina
Gly-642	2	Clorogénico, Pirogalol
Ser-638	2	Biocanina, Formononetina
Asn-757	2	Clorogénico, Hesperetina
Tyr-660, Thr-645 y Gly-646	1	Biocanina
Val-758 y Arg-792	1	Clorogénico
Thr-745 y Leu-639		Formononetina

Tabla 7: Ligandos agrupados por las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de la enzima DNMT 6BRR, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Ser-892	9	Todos
Phe-640	8	Biocanina A, Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaemferol, Miricetina, Pirogalol, Quercetina
Asp-641	7	Biocanina A, Ácido Clorogénico, Crisina, Formononetina, Hesperetina, Miricetina, Quercetina
Gly-642	7	Biocanina A, Ácido Clorogénico, Formononetina, Hesperetina, Miricetina, Pirogalol, Quercetina
Trp-893	6	Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaemferol, Miricetina, Quercetina
Pro-709	6	Biocanina A, Formononetina, Hesperetina, Kaemferol, Miricetina, Quercetina
Gly-707 y Arg-891	6	Biocanina A, Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaemferol, Quercetina
Ser-708	5	Biocanina A, Ácido Clorogénico, Crisina, Formononetina, Kaemferol
Tyr-660, Glu-756 y Ile-705	4	Biocanina A, Crisina, Formononetina, Kaemferol
Gly-706 y Leu-639 y Ala-644	2	Crisina, Kaemferol
Gly-646	2	Biocanina A, Formononetina
Val-665, Ser-663, Glu-664 y Asp-686	1	Ácido Clorogénico
Thr-645 y Ser-368	1	Biocanina A
Ser-638	1	Formononetina

Tabla 8: Ligandos agrupados por las interacciones por enlace de H con los aminoácidos de la enzima DNMT 5YX2, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Thr-645	7	Clorogénico, Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Pirogalol, Quercetina
Gly-646	6	Crisina, Formononetina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Leu-639	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Glu-756	4	Biocanina, Clorogénico, Hesperetina, Quercetina
Ser-638	4	Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Arg-891	3	Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Asp-641	2	Miricetina, Pirogalol
Ile-643	2	Clorogénico, Pirogalol
Arg-790 y Gly-890	1	Clorogénico
Cys-710 y Trp-893	1	Biocanina
Gly-707 y Tyr-660	1	Formononetina
Ser-368	1	Crisina

Tabla 9: Ligandos agrupados por las interacciones por enlace de H con los aminoácidos de la enzima DNMT 6BBR, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Thr-645	8	Clorogénico, Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Pirogalol, Quercetina
Cys-710	5	Biocanina, Formononetina, Hesperetina, Miricetina, Quercetina
Ile-643	5	Ácido Clorogénico, Hesperetina, Miricetina, Pirogalol, Quercetina
Arg-891	3	Ácido Clorogénico, Miricetina, Pirogalol
Asp-641	2	Kaemferol, Pirogalol
Gly-646 y Ser-638	2	Crisina, Kaemferol
Leu-888	2	Miricetina, Pirogalol
Glu-664	1	Quercetina
Glu-756, Gly-707, Phe-640, Trp-893 y Val-687	1	Ácido Clorogénico

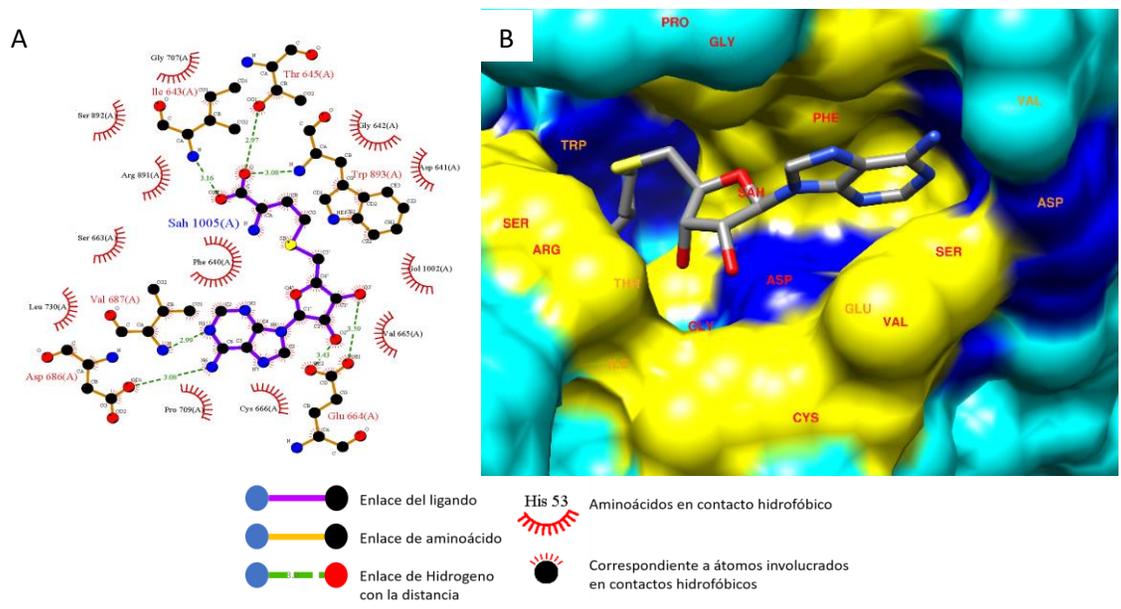


Figura 5. Representación en 2D (A) y 3D (B) del ligando de referencia (SHA) en interacción con la DNMT 5YX2

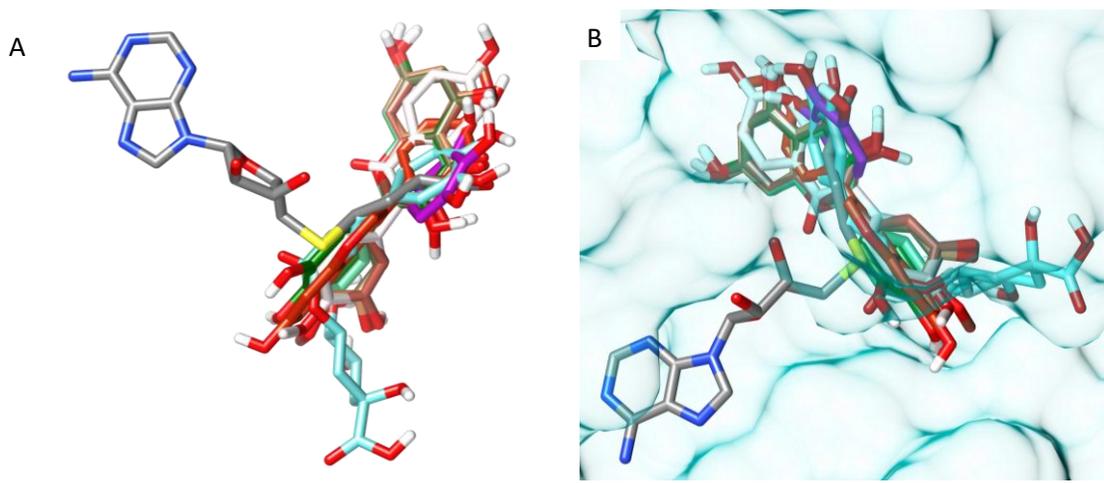


Figura 6. Representación en 3D (A) de todos los ligandos con el de referencia sin la enziam DNMT, (B) con la enzima DNMT. Solo los carbonos diferencian a los ligandos, en el de referencia son gris y en los ligandos fenólicos se seleccionó de manera aleatoria.

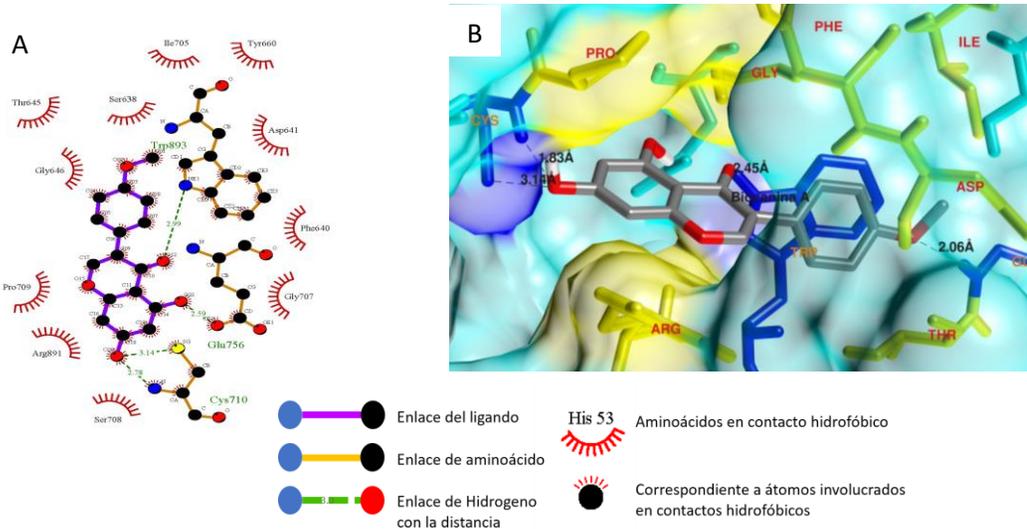


Figura 7. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la biocanina A interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La biocanina A que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

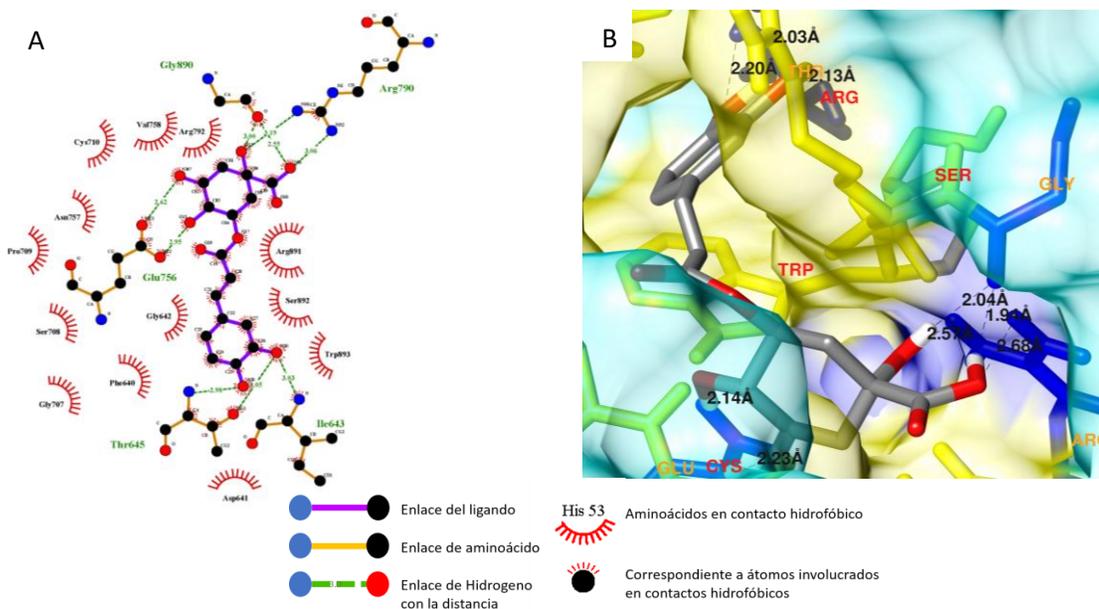


Figura 8 Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo del ácido clorogénico interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). El ácido clorogénico que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

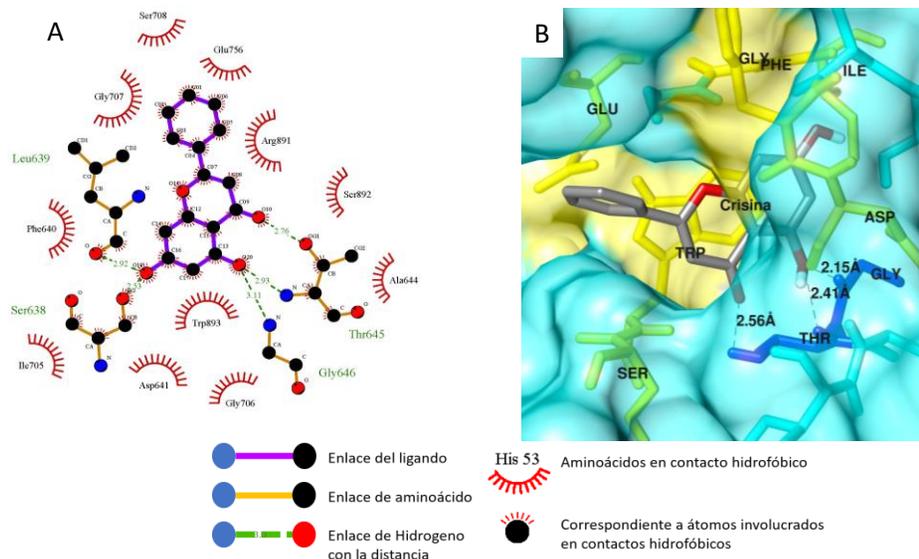


Figura 9. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la crisina interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La crisina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

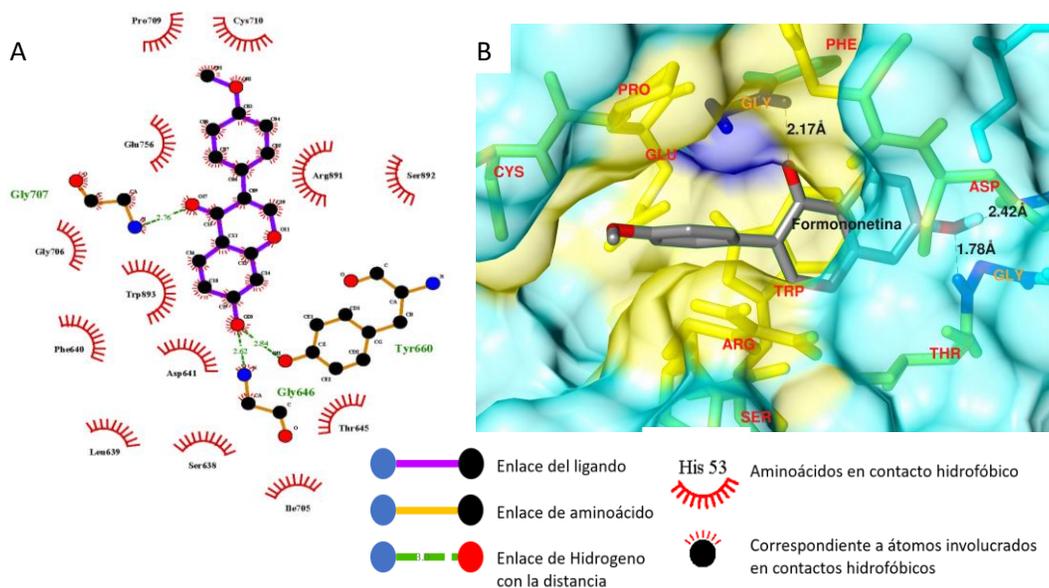


Figura 10. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la formononetina interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La formononetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

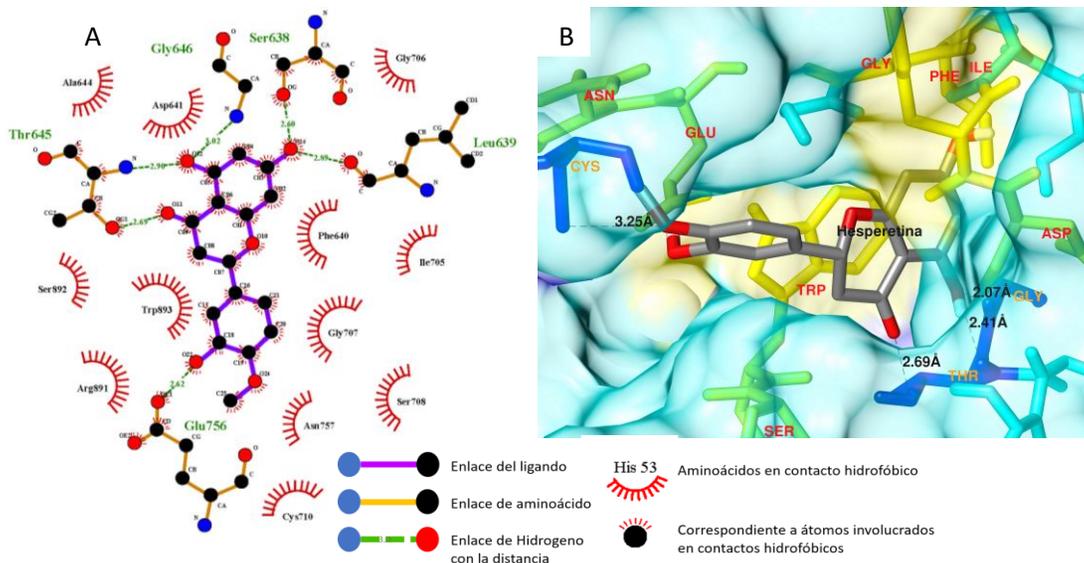


Figura 11. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la hesperetina interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La hesperetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

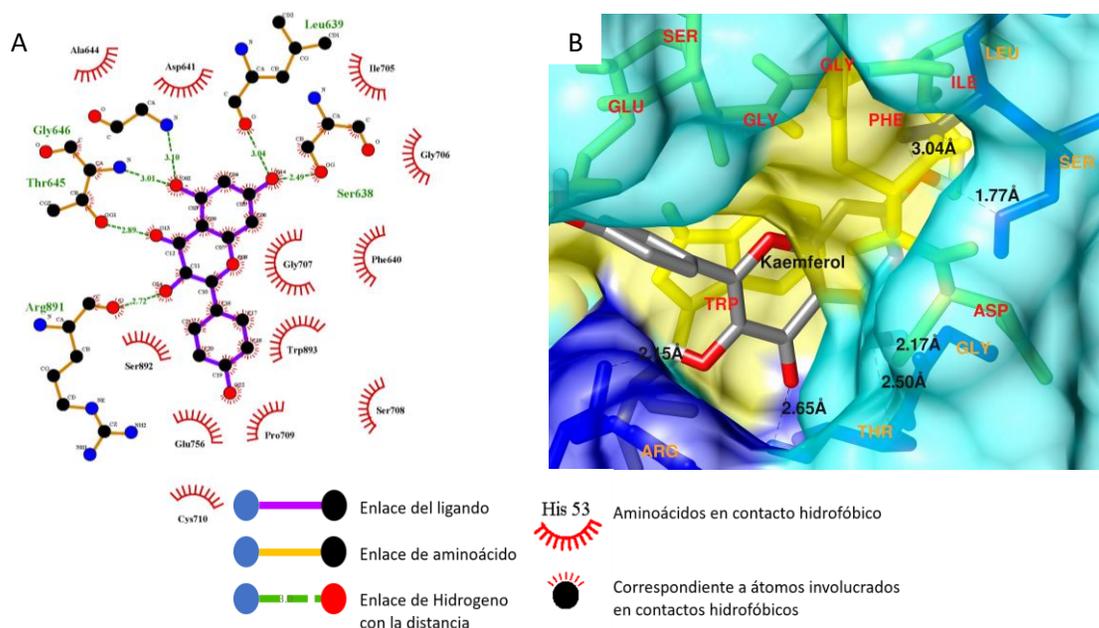


Figura 12. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la kaempferol interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). El kaempferol que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

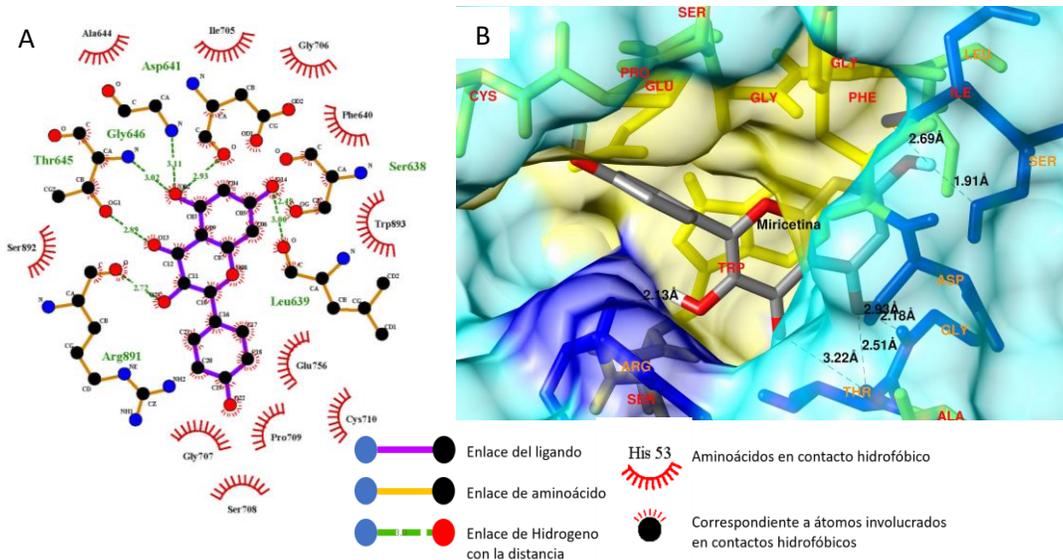


Figura 13. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la miricetina interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La miricetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

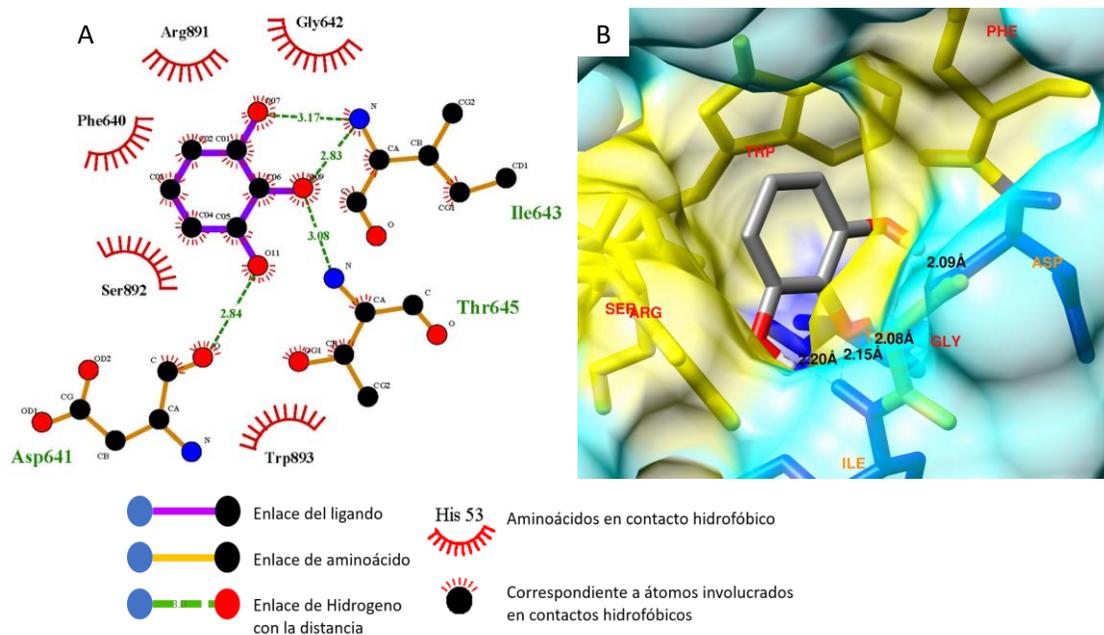


Figura 14. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo del pirogalol interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). El pirogalol que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

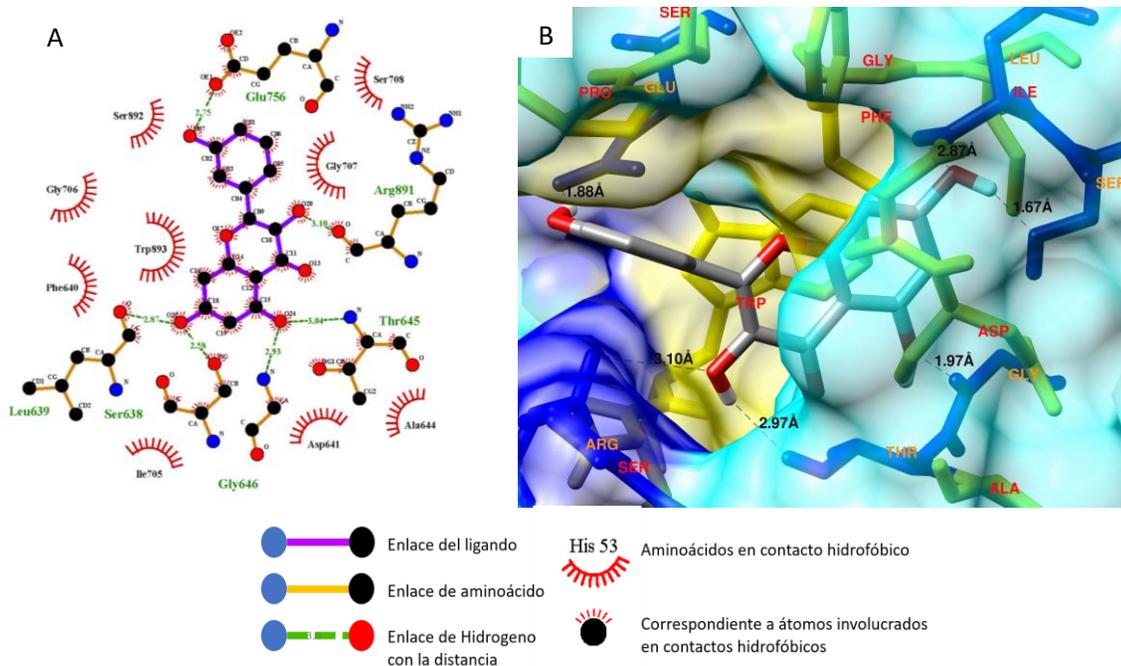


Figura 15. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la quercetina interactuando con la enzima DNMT 5YX2. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La quercetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

### 3.2 Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos con la enzima Acetiltransferasa de Histona HAT

La enzima acetiltransferasa (HAT), propia de la acetilación, provoca el relajamiento de la cromatina (eucromatina) aumentando la accesibilidad de los factores de transcripción y esto conlleva a la activación genética. Esta enzima debilita la unión de las histonas y el ADN neutralizando la carga positiva de la lisina mediante la transferencia de un grupo acetilo “acetil-CoA” (Bueno y Perez-Gonzalez, 2017) .

La enzima histona acetiltransferasa p300 regula la transcripción a través del remodelado de la cromatina. Acetila los cuatro núcleos de histonas en el nucleosoma. La acetilación produce señales epigenéticas para la activación transcripcional. Media la acetilación de la histona H3 en 'Lys-122' (H3K122ac), una modificación que se localiza en la superficie del octámero de histona y estimula la transcripción, posiblemente al promover la inestabilidad de los nucleosomas. Cataliza además la acetilación de la histona H3 en 'Lys-27' (H3K27ac). También posee otras dianas de proteínas que no son histonas. UniProtKB-Q09472 (EP300\_HUMAN). (22/10/2019). Obtenido de <https://www.uniprot.org/uniprot/Q09472>.

En la tabla 10 se resumen las variables evaluadas: energía libre, constante de inhibición y eficiencia del ligando entre los mejores modelos de los ligandos con las enzimas HAT. En la literatura, el **ácido cafeico**, que es un ácido hidroxicinámico, forma estructuras complejas como los taninos hidrolizables, los que contienen importantes beneficios para la salud, incluyendo la supresión del cáncer. Este se reporta como un inhibidor de la actividad enzimática de la DNMT en varios modelos de cáncer de mama, inhibiendo la metilación del promotor RAR $\beta$  en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 (Bora-Tatar *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012).

También ha sido reportado como un inhibidor de la HDAC *in silico* con una energía libre de  $-6.77 \text{ Kcal/mol}$  y una constante de inhibición de  $1.08 \mu\text{M}$ . Ha sido considerado como una estructura líder promisoría para los inhibidores de la HDAC que tienen el potencial de proporcionar nuevas terapias para enfermedades como las neurodegenerativas, enfermedades hereditarias e inflamatorias y el cáncer (Carlos-Reyes *et al.*, 2019).

El mejor modelo obtenido del acoplamiento entre la enzima 3BIY y este fenol obtuvo una energía libre de  $-6.06 \text{ Kcal/mol}$  con una constante de inhibición  $36 \mu\text{M}$  y de eficiencia del ligando  $-0.47$ . Las interacciones intermoleculares resultaron ser ligeramente débil según la figura 3, mientras que la eficiencia del ligando se encuentra dentro del rango de aceptación. Mientras que en la enzima 5KJ2 no existieron diferencias notables, la energía libre de  $-6.05 \text{ Kcal/mol}$  y constante de inhibición de  $36.6 \mu\text{M}$ , ligeramente más notable en la eficiencia del ligando con  $-0.45$ .

León *et al.* (2016) evidenciaron que la **crisina** protege significativamente contra múltiples parámetros en el modelo EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) en modelos animales con esclerosis múltiple, regulando la actividad de las enzimas

HAT/HDAC. En nuestro trabajo, el mejor modelo obtenido del acoplamiento entre la enzima 3BIY y este fenol obtuvo valores de  $-9.15 \text{ Kcal/mol}$  de energía libre, constante de inhibición de  $194.9 \text{ nM}$  y una eficiencia del ligando de  $-0.48$ , resultando como uno de los valores de interacción más fuertes del acoplamiento con esta enzima.

Aunque menor fuerza de interacción, los resultados del acoplamiento con la enzima 5KJ2 fueron favorables, con una energía libre  $-7.87 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición  $1.70 \text{ }\mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.41$ . Esta diferencia se debe principalmente a las diferencias estructurales entre estas dos enzimas. De todas formas, los resultados se encuentran dentro de los parámetros aceptados para la selección de un posible candidato.

El ácido **p-cumárico** al igual que el cafeico, ha sido identificado como un inhibidor de la HDAC, además tiene como blanco las enzimas SIRTi (SIRT1 y 2) e incrementa la acetilación en p53 (Link *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2011).

El mejor modelo obtenido del acoplamiento entre la enzima 3BIY con el **ácido p-cumárico**, resultó con los valores más débiles de interacción en comparación con los otros ligandos empleados para esta enzima. El mejor modelo obtenido para este ligando mostró un valor de energía libre de  $-5.69 \text{ Kcal/mol}$ , moderadamente débil según la *figura 3* con una constante de inhibición de  $67.6 \text{ }\mu\text{M}$  y una afinidad de enlace de  $-0.47$ . Los valores de los modelos obtenidos para la enzima 5KJ2 resultaron con una fuerza de interacción ligeramente más débil, con energía libre de  $-5.48$ , constante de inhibición  $96.6 \text{ }\mu\text{M}$  y una eficiencia del ligando de  $-0.46$ .

Este es un ácido hidroxicinámico y se ha reportado como inhibidor en modelos *in vitro* de la DNMT en cáncer de esófago a una concentración de  $2 \text{ a } 5 \times 10^{-7}$ , y la HDAC en cáncer de colon y cérvix a concentraciones de  $1 \text{ a } 2 \times 10^{-3}$ . A pesar de mostrar una baja interacción debido a la energía libre, esto no es concluyente, ya que se necesita evaluar otros factores relacionados con la farmacocinética para lograr determinar un potencial inhibidor (Link *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2011; Schneckengerber *et al.*, 2014).

La **hesperetina** es un flavonoide que sus efectos han sido relacionados con la prevención de la obesidad, la diabetes y la actividad antioxidante. En el cáncer, este compuesto inhibe la proliferación celular, inducen citotoxicidad, suprimen la angiogénesis y causa la muerte celular por apoptosis. También se ha relacionado con los efectos melanogénicos estimulando la síntesis de melanina. Este polifenol ha sido reportado como un inhibidor de la DNMT regulando indirectamente la metilación del ADN (Liu-Smith y Meyskens, 2016; Tripathi, 2018).

El mejor modelo obtenido para este ligando mostró una energía libre de unión de  $-8.96 \text{ Kcal/mol}$ , valor de interacción moderadamente fuerte, la constante de inhibición de  $271.1 \text{ nM}$  y eficiencia del ligando  $-0.41$ . Sin embargo, para la enzima 5KJ2 la energía libre de unión fue de  $-8.15 \text{ Kcal/mol}$ , con una constante de inhibición de  $1.1 \text{ }\mu\text{M}$  y una eficiencia del ligando de  $-0.37$ . Como se observa, los resultados de la hesperetina en la enzima 3BIY resultaron poseer una fuerza de interacción más fuerte que para la enzima 5KJ2, lo que puede deberse a una mejor compatibilidad

estructural entre este ligando y la primera enzima, a pesar de esto, ambos valores son potencialmente favorables para establecer el acoplamiento.

El **ácido homogentísico**, fue el segundo ligando con valores más bajos y muy semejantes al ácido cumárico. No se encontraron referencias sobre algún experimento donde se evalúe su actividad sobre el epigenoma. El mejor modelo de este ligando con la enzima 3BIY, presento un valor de energía libre de  $-5.70 \text{ Kcal/mol}$ , con una constante de inhibición de  $65.9 \mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.47$ . Mientras que para la enzima 5KJ2 los valores de interacción fueron discretamente más débiles, con una energía libre de  $-5.27 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $137.7 \mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.44$ . A pesar de ser valores de interacción relativamente débiles, estos se encuentran dentro de los rangos de interacción entre ligando y su diana biológica como se muestra en la figura 3.

Para el **kaempferol**, el mejor modelo obtenido en el acoplamiento con la enzima 3BIY, presentó una interacción moderadamente fuerte con una energía libre de  $-9.57 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $96.3 \text{ nM}$  y eficiencia del ligando de  $-0.46$ . Aunque ligeramente más débiles, los valores de interacción obtenidos del mejor modelo con la enzima 5KJ2 fueron favorables. La energía libre fue de  $-8.11 \text{ Kcal/mol}$ , la constante de inhibición de  $1.1 \mu\text{M}$  y la eficiencia del ligando de  $-0.39$ .

El mejor modelo obtenido del acoplamiento entre la **miricetina** y la enzima 3BIY, alcanzó los valores de interacción más fuertes en cuanto a las variables evaluadas, energía de enlace de  $-9.60 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $92.3 \text{ nM}$  y eficiencia del ligando de  $0.48$ . Sin embargo, con la enzima 5KJ2 los resultados fueron discretamente más débiles, la energía libre fue de  $-8.13 \text{ Kcal/mol}$ , la constante de inhibición de  $1.1 \mu\text{M}$  y la eficiencia del ligando de  $-0.41$ .

La **quercetina** es un flavonol que al igual que la miricetina, se ha demostrado que es capaz de regular positivamente el factor de transcripción HIF-1  $\alpha$  y regular negativamente el oncogén c-Myc y la catenina- $\beta$  a través de la vía SIRT1. Se ha demostrado que aumenta la expresión de ARNm de PGC-1 alfa y SIRT1, activa SIRT1 y aumenta la fosforilación de AMPK en células HepG2 e induce la desacetilación de histona H3 en células de cáncer de próstata humano. Dependiendo de las condiciones de los experimentos, la quercetina podía tener efectos estimulantes o inhibitorios sobre el epigenoma, con actividad sobre la HDAC y la DNMT (Ayissi *et al.*, 2014).

El mejor modelo del acoplamiento obtenido entre la quercetina y la enzima 3biy mostró valores de interacción relativamente fuertes con una energía libre de  $9.02 \text{ Kcal/mol}$  y constante de inhibición de  $245.04 \text{ nM}$ , la eficiencia del ligando fue de  $-0.48$ . Mientras que el mejor modelo con 5KJ2 los resultados fueron discretamente más débiles, sin embargo fue para esa enzima el que obtuvo los valores de interacción más fuertes, con una energía libre de  $-8.15 \text{ Kcal/mol}$  y constante de inhibición de  $1.1 \mu\text{M}$ , la eficiencia del ligando fue de  $-0.37$  de.

El **ácido sulfosalicílico** es un antioxidante al igual que el ácido homogentísico, sin embargo, en la literatura no se encuentran estudios e que evidencie una posible actividad sobre el epigenoma, sin embargos, ambos resultaron tener semejanza estructural frente a compuestos que si poseían esa actividad (Aguirre *et al.*, 2018).

El mejor modelo obtenido de la interacción entre este ligando y la enzima 3BIY, presento valores de interacción relativamente débiles, con una de energía libre de  $-6.23 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $26.91 \mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.44$ . Mientras que el mejor modelo obtenido con la enzima 5KJ2 evidenció el resultado de interacción más débil del acoplamiento para esta enzima, con una energía libre de  $-5.25 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $142 \mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.37$ .

La mayoría de los resultados obtuvieron una fuerza de interacciones considerable, siendo la enzima 3BIY la que ostento los mejores resultados. Sin embargo es importante recalcar que estos resultados son predictivos y hay que evaluarlos en posteriores experimentos *in vitro* sobre esta enzima o con otros estudios *in silico* de optimización. Los resultados mostrados son satisfactorios, pero no son indicativos suficientes para la selección del mejor inhibidor, aunque si el más probable. (Meneses y Cuesta, 2015).

En las tablas 11 y 12 se muestran las interacciones hidrofóbicas más frecuentes entre los aminoácidos con cada modelo de ligando escogido. En la figura 16 se encuentra el ligando de referencia con su enzima (3BIY) en 2D y 3D, mientras que en la figura 17 se agrupan todos los ligandos incluidos el de referencia, permitiendo apreciar las posiciones de los ligandos en el acoplamiento molecular con respecto al de referencia. En las figuras 18-26 se observan las interacciones hidrofóbicas y de enlace de hidrógeno establecidas entre los ligandos y la enzima 3BIY.

De los 16 aminoácidos de la enzima 3BIY que tuvieron interacciones hidrofóbicas con los modelos obtenidos de los fenoles, al compararlo con el ligando de referencia, ocho coincidieron en su interacción, mientras que cinco mostraron otra interacción y solo cuatro no interactuaron. Las interacciones hidrofóbicas más frecuentes establecidas entre los mejores modelos de los nueve ligandos y los aminoácidos fueron: siete con Isoleucina (1435) y con Serina (1396), seis con Leucina (1398) y Tirosina (1446).

De los 20 aminoácidos de la enzima 5KJ2 que tuvieron interacción hidrofóbica con los modelos obtenidos de los fenoles, al compararlo con el ligando de referencia, 13 coincidieron en su interacción, dos mostraron una interacción diferente y solo cinco no interactuaron. Las interacciones hidrofóbicas más frecuentes establecidas entre los modelos obtenidos de los nueve ligandos y los aminoácidos fueron: cinco con Prolina (1440), cinco con Histidina (1451), cinco con Leucina (1398 y 1463) y cuatro con Prolina (1458).

De los 13 aminoácidos de la enzima 3BIY que tuvieron interacción por enlace de H con los modelos obtenidos de los fenoles, al compararlo con el ligando de referencia, seis coincidieron en su interacción, cuatro mostraron otra interacción y

solo tres no interactuaron. Las interacciones por enlace de H más frecuentes establecidas entre los modelos de los nueve ligandos y los aminoácidos fueron: seis con Isoleucina (1395), seis con Triptófano (1436) y cinco con (1467).

De los 13 aminoácidos de la enzima 3BIY que tuvieron interacción por enlace de H con los modelos obtenidos de los fenoles, al compararlo con el ligando de referencia, solo dos coincidieron en su interacción, cinco mostraron otra interacción y seis no interactuaron. Las interacciones por enlace de H más frecuentes establecidas entre los modelos de los nueve ligandos y los aminoácidos fueron: cinco con Arginina (1462), cuatro con Arginina (1410) y cuatro con Tirosina (1467).

Las diferencias obtenidas en las coincidencias entre las enzimas 3BIY y 5KJ2 con los ligandos utilizados, son la consecuencia de pequeñas variaciones en la estructura de estas enzimas debido al ligando utilizado en la cristalización. A pesar de que la enzima 5KJ2 mostro mayores coincidencias en las interacciones hidrofóbicas, la enzima 3BIY evidencio los valores más fuertes de interacción con los ligandos. Las limitaciones de considerar la enzima como una estructura rígida evitan la obtención de un mejor modelo, sin embargo estos resultados son una aproximación de la posible unión entre estos fenoles y su diana biológica y se hace necesaria su confirmación mediante estudios *in vitro*.

Tabla 10: Parámetros evaluados en el acoplamiento entre los mejores modelos de cada ligando con las enzimas HAT 3BIY y 5KJ2

Ligando	Tc	HAT 3BIY		LE	HAT 5KJ2		LE
		$\Delta G$ (Kcal/mol)	Ki	kcal/mol/ atom	$\Delta G$ (Kcal/mol)	Ki	kcal/mol/ atom
Ácido cafeico C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.90	-6.06	36 $\mu$ M	-0.47	-6.05	36.6 $\mu$ M	-0.45
Crisina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	0.86	-9.15	194.9 nM	-0.48	-7.87	1.70 $\mu$ M	-0.41
Ácido cumárico C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0.90	-5.69	67.6 $\mu$ M	-0.47	-5.48	96.6 $\mu$ M	-0.46
Hesperetina C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0.91	-8.96	271.1 nM	-0.41	-8.15	1.1 $\mu$ M	-0.37
Ácido homogentísico C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0.90	-5.70	65.9 $\mu$ M	-0.47	-5.27	137.7 $\mu$ M	-0.44
Kaempferol C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	0.86	-9.57	96.3 nM	-0.46	-8.11	1.1 $\mu$ M	-0.39
Miricetina C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	0.86	-9.60	92.3 nM	-0.48	-8.13	1.1 $\mu$ M	-0.41
Quercetina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0.86	-9.02	245.04 nM	-0.41	-8.15	1.1 $\mu$ M	-0.37
Ácido sulfosalicílico C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S	0.90	-6.23	26.91 $\mu$ M	-0.44	-5.25	142 $\mu$ M	-0.37

Tabla 11: Ligandos agrupados por las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de la enzima HAT 3BIY, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Ile-1435 y Ser-1396	7	Ácido cafeico, Crisina, Hesperetina, Ácido homogentísico, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Leu-1398	6	Ácido cafeico, Crisina, Ácido p-cumárico, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina
Tyr-1446	6	Crisina, Hesperetina, Ácido homogentísico, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Leu-1463	3	Ácido cafeico, Miricetina, Ácido sulfosalicílico
Tyr-1394	3	Ácido cafeico, Crisina, Hesperetina
Tyr-1397	3	Crisina, Ácido homogentísico, Quercetina
Cys-1438	2	Hesperetina, Kaempferol
Tyr-1414	2	Ácido p-cumárico, Ácido sulfosalicílico
Tyr-1467	2	Ácido homogentísico, Quercetina
Gln-1455 y Ser-1400	1	Ácido p-cumárico
Ile-1395	1	Quercetina
Pro-1458	1	Ácido sulfosalicílico
Trp-1436 y Trp-1466	1	Miricetina

Tabla 12: Ligandos agrupados por las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de la enzima HAT 5KJ2, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Pro-1440	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Leu-1463 y Leu-1398	5	Ácido cafeico, Crisina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
His-1451	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Pro-1458	4	Ácido p-cumárico, Hesperetina, Ácido homogentísico, Miricetina
Tyr-1446	3	Hesperetina, Kaempferol, Miricetina
Lys-1456	3	Crisina, Ácido homogentísico, Miricetina
Ile-1457	3	Crisina, Miricetina, Quercetina
Asp-1445	3	Crisina, Kaempferol, Quercetina
Gln-1455	2	Ácido p-cumárico, Ácido homogentísico
Cys-1438	2	Crisina, Miricetina
Ala-1437	2	Kaempferol, Quercetina
Asp-1444 y Pro-1439	2	Crisina, Quercetina
Tyr-1414 y Trp-1466	2	Ácido cafeico, Ácido sulfosalicílico
Asp-1399	2	Hesperetina, Kaempferol
Ser-1400	2	Ácido p-cumárico, Hesperetina
Leu-1418	1	Ácido cafeico
Arg-1410	1	Hesperetina

Tabla 13: Ligandos agrupados por las interacciones por enlace de H con los aminoácidos de la enzima HAT 3BIY, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Ile-1395	6	Ácido cafeico, Crisina, Hesperetina, Ácido homogentísico, Kaempferol, Miricetina
Trp-1436	6	Ácido cafeico, Crisina, Hesperetina, Ácido homogentísico, Kaempferol, Quercetina
Tyr-1467	5	Ácido cafeico, Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina
Tyr-1394	3	Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Arg-1410 y Thr-1411	2	Ácido p-cumárico, Ácido sulfosalicílico
Gly-1506	2	Kaempferol, Quercetina
Leu-1398	2	Ácido homogentísico, Quercetina
Arg-1462 y Trp-1466	1	Ácido sulfosalicílico
Asp-1399	1	Ácido p-cumárico
Cys-1438	1	Ácido homogentísico
Tyr-1397	1	Hesperetina

Tabla 14: Ligandos agrupados por las interacciones por enlace de H con los aminoácidos de la enzima HAT 5KJ2, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Arg-1462	5	Ácido cafeico, Ácido p-cumárico, Hesperetina, Ácido homogentísico, Ácido sulfosalicílico
Arg-1410	4	Ácido cafeico, Ácido p-cumárico, Ácido homogentísico, Ácido sulfosalicílico
Tyr-1467	4	Ácido cafeico, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Asp-1444	3	Hesperetina, Kaempferol, Miricetina
Gln-1455	3	Crisina, Hesperetina, Miricetina
Ser-1400	3	Ácido homogentísico, Kaempferol, Quercetina
Asp-1399	2	Ácido p-cumárico, Quercetina
Cys-1438	2	Kaempferol, Quercetina
Lys-1456	2	Ácido p-cumárico, Hesperetina
Tyr-1446	2	Crisina, Quercetina
His-1402 y Tyr-1414	1	Ácido homogentísico
Leu-1398	1	Hesperetina

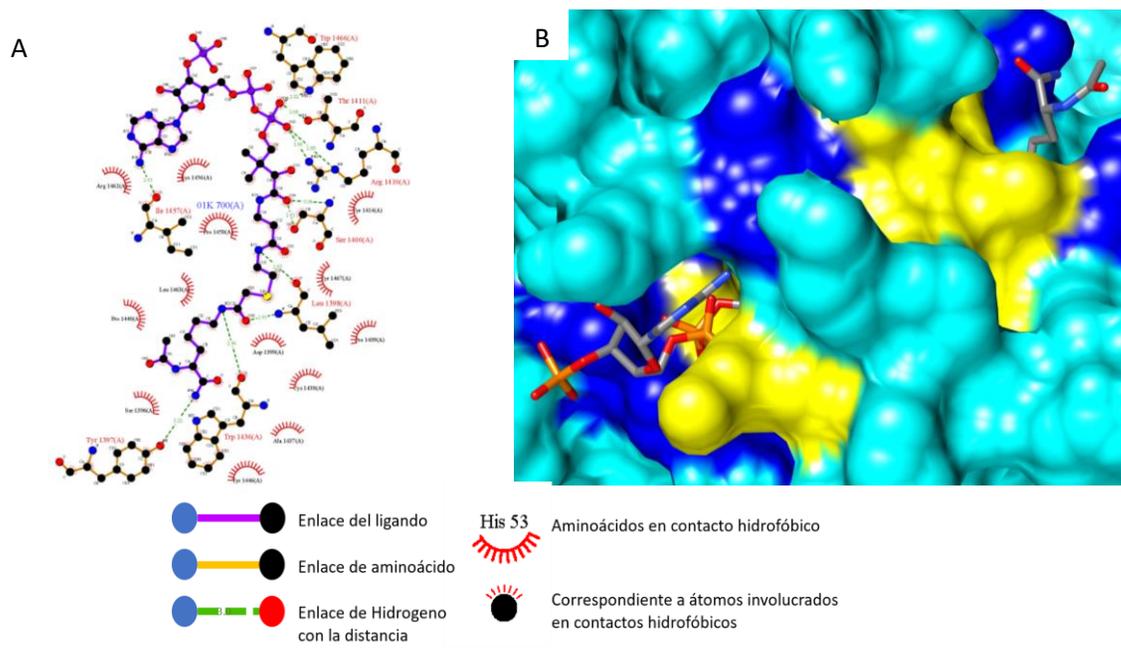


Figura 16. Representación en 2D (A) y 3D (B) del ligando de referencia (K01) en interacción con la enzima HAT 3BIY

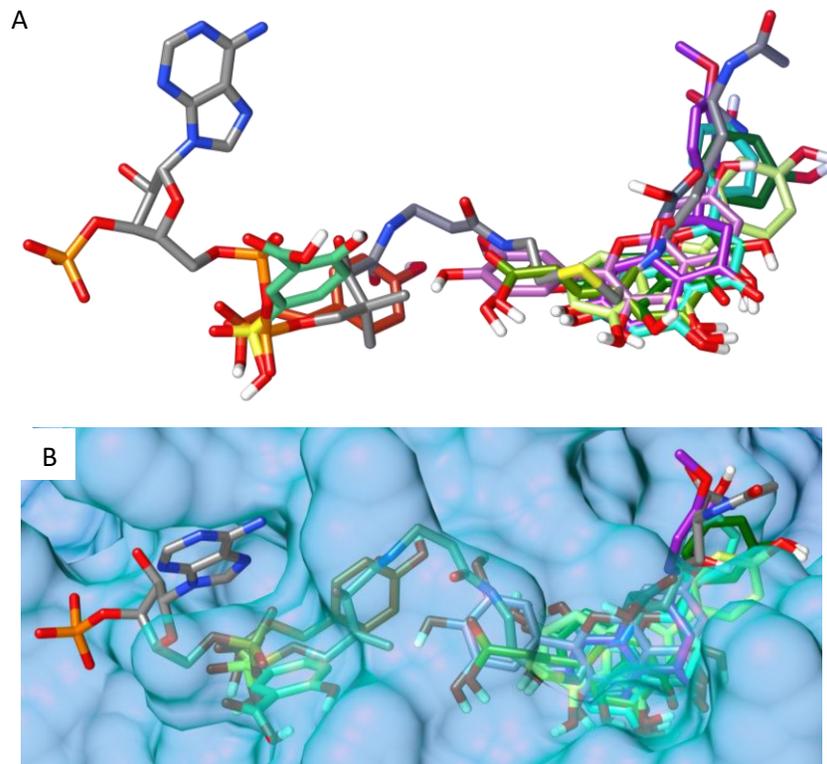


Figura 17. Representación en 3D (A) de todos los ligandos con el de referencia sin la enziam HAT, (B) con la enzima HAT. Solo los carbonos diferencian a los ligandos, en el de referencia son gris y en los ligandos fenólicos se seleccionó de manera aleatoria.



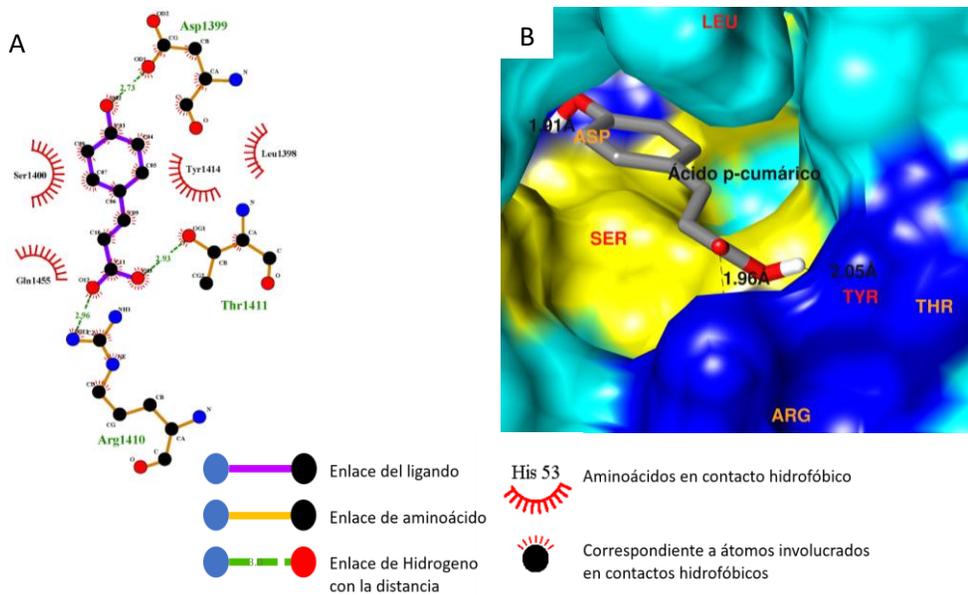


Figura 20. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo del ácido p-cumárico interactuando con la enzima HAT 3BIY. En 3D, se representa en color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están en color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). En el ácido p-cumárico que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

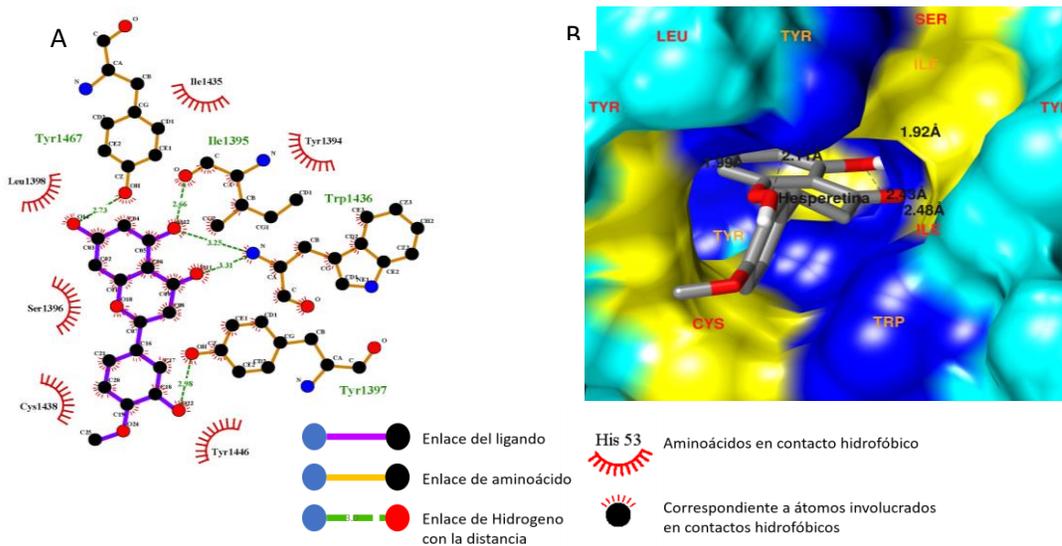


Figura 21. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la hesperetina interactuando con la enzima HAT 3BIY. En 3D, se representa en color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están en color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). En la hesperetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

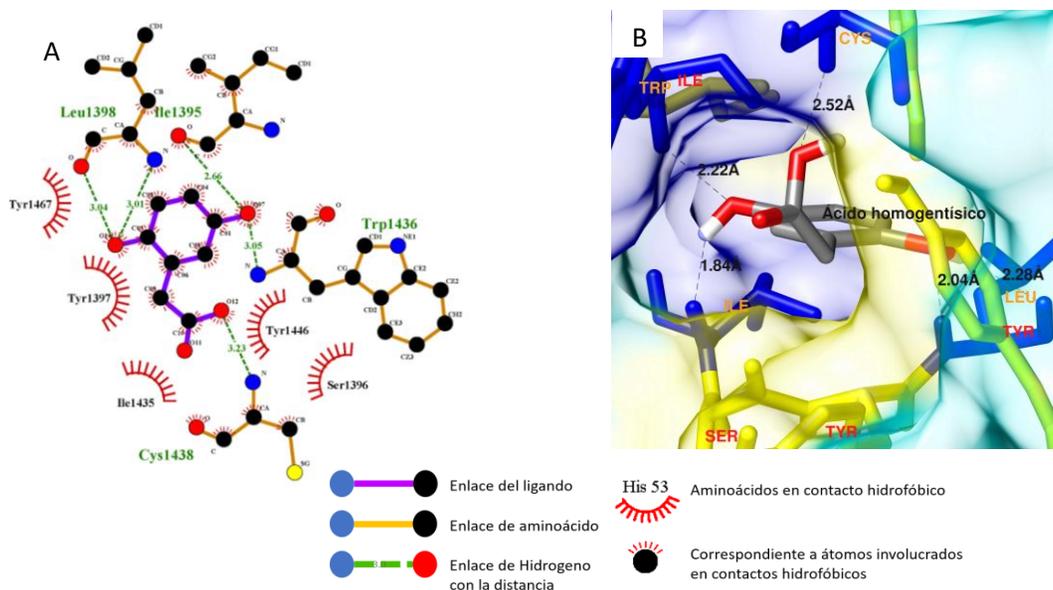


Figura 22. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo del ácido homogentísico interactuando con la enzima HAT 3BIY. En 3D, se representa en color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están en color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). En el ácido homogentísico que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno v blanco hidrógeno

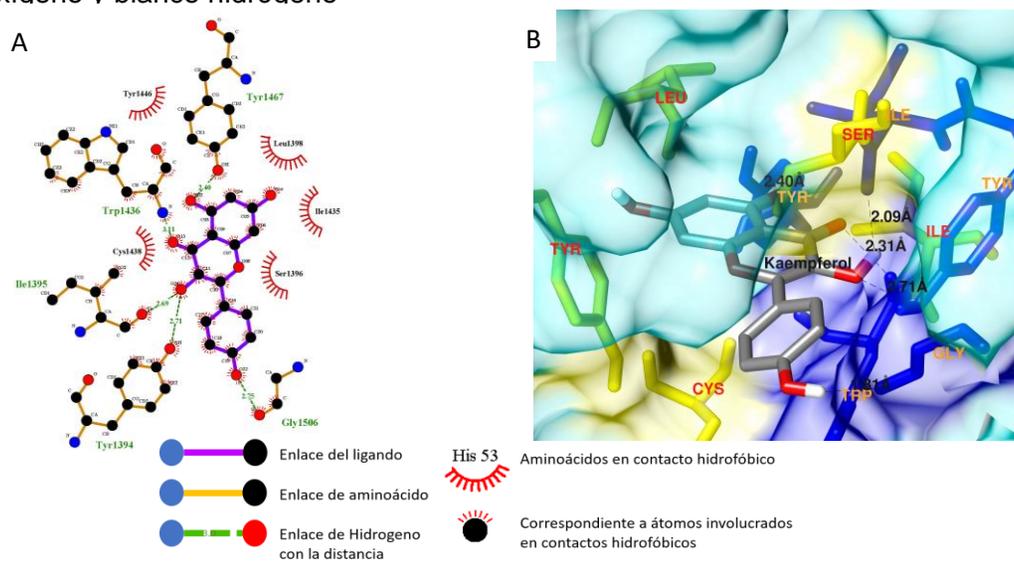


Figura 23. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la kaempferol interactuando con la enzima HAT 3BIY. En 3D, se representa en color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están en color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). En el kaempferol que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

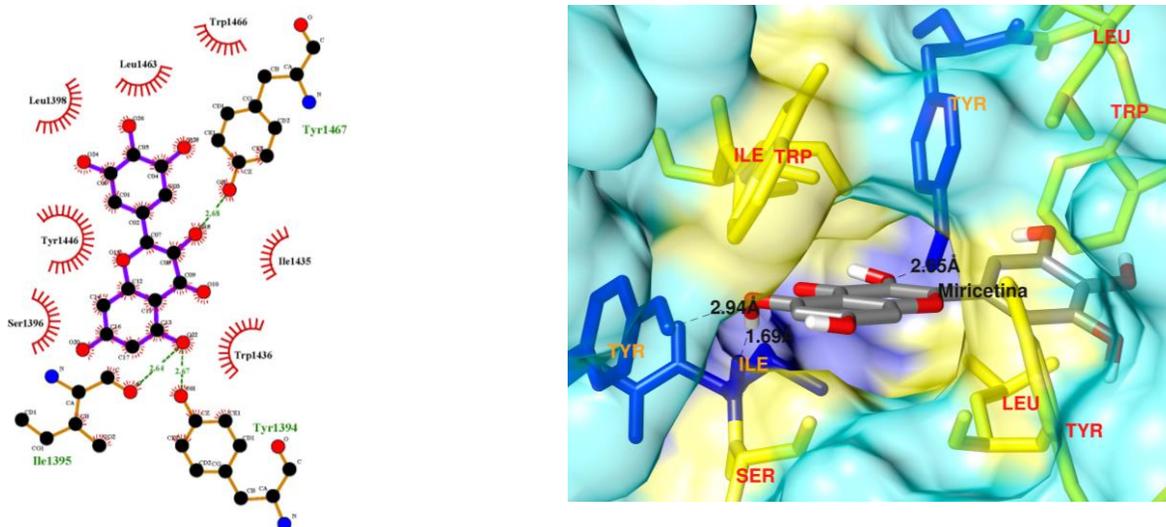


Figura 24. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la miricetina interactuando con la enzima HAT 3BIY. En 3D, se representa en color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están en color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). En la miricetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

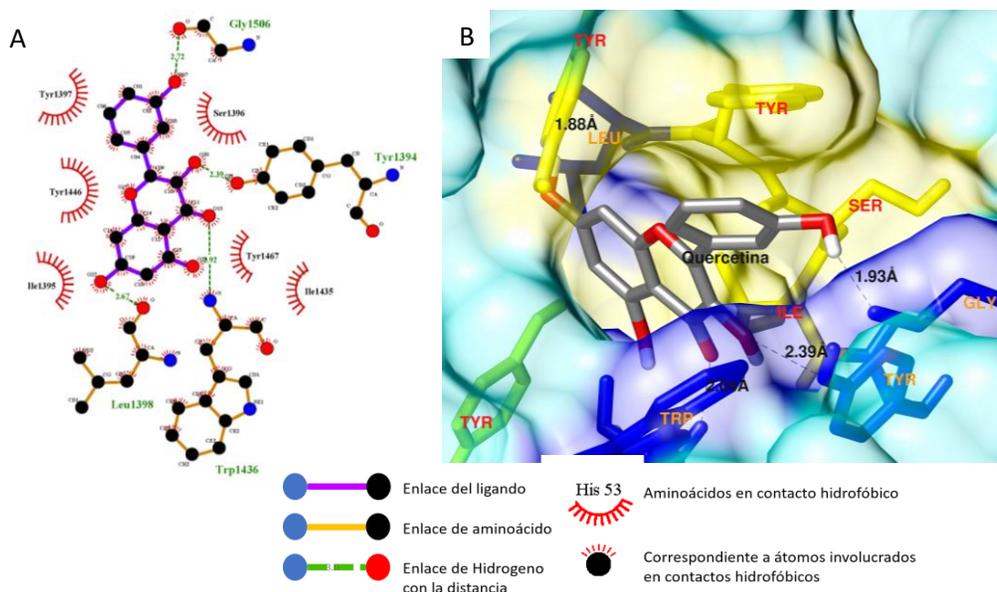


Figura 25. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la quercetina interactuando con la enzima HAT 3BIY. En 3D, se representa en color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están en color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). En la quercetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

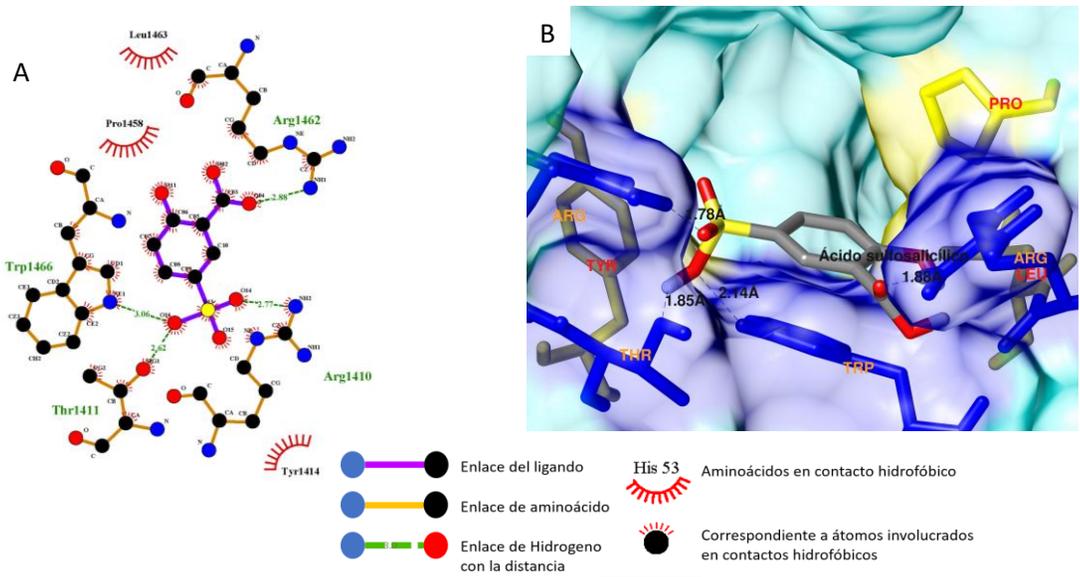


Figura 26. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo del ácido sulfosalicílico interactuando con la enzima HAT 3BIY. En 3D, se representa en color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están en color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). En el ácido sulfosalicílico que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

### 3.3 Acoplamiento molecular de compuestos fenólicos con la enzima Desacetilasa de Histonas HDAC

Las desacetilasas (HDACs), propia de desacetilación, causa el efecto contrario a las acetilasas, transformando la cromatina en heterocromatina y provocando el silenciamiento genético. En este caso la desacetilasa elimina los grupos acetilos lo que fortalece la unión del ADN y la cromatina. Actualmente se están estudiando inhibidores de la desacetilasa para el tratamiento de la esclerosis múltiple (Bueno y Perez-Gonzalez, 2017).

La enzima empleada en este estudio, la desacetilasa de Histona 2, es la responsable de desacetilar los residuos de lisina en la región N-terminal de las histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4). Proporciona una señal para la represión epigenética y juega un rol importante en la regulación de la transcripción, la progresión del ciclo celular y los eventos de desarrollo. Actúa a través de la formación de grandes complejos multiproteicos. Forma complejos correpresores transcripcionales al asociarse con MAD, SIN3, YY1 Y N-COR. Interactúa en la fase S tardía de la replicación del ADN con la DNMT1 en el otro complejo represor transcripcional compuesto por DNMT1, DMAP1, PCNA, CAF1 UniProtKB-Q92769 (HDAC2\_HUMAN). (22/10/2019). Obtenido de <https://www.uniprot.org/uniprot/Q92769>.

Desacetila el gen TSHZ3 y regula su actividad represora transcripcional. Es componente de un complejo RCOR/GFI/KKDM1A/HDAC que suprime, a través del reclutamiento de histonas desacetilasa, una serie de genes implicados en el desarrollo de células sanguíneas de múltiples líneas. Pude estar involucrado en la represión transcripcional de genes dianas circadianos como PER1, mediado por CRY1 a través de la desacetilación de histonas. Participa en la correpresión transcripcional mediada por MTA1 de TFF1 y CDKN1A (3)

En la tabla 15 se resumen las variables evaluadas: energía libre, constante de inhibición y eficiencia del ligando entre los mejores modelos de los ligandos con las enzimas HDAC. **La crisina** ha sido caracterizado como un agente citotóxico para células cancerosas de mama, colon y próstata. Presenta funciones inhibitorias sobre la actividad de la enzima HDAC-8 y provoca la detención del ciclo celular en la fase G1 mediante la regulación de diversas modificaciones de proteínas e histonas (H3acK14, H4acK12, H4acK16, y H3K9 me2) del ciclo celular en el promotor p21. El ligando TRAIL es un inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral que no afecta las células sanas, pero se ha observado cierta resistencia en algunos tipos de cáncer. Se ha descubierto que la crisina es capaz de superar la resistencia de TRAIL en las líneas celulares de cáncer de pulmón y cervical humano al inhibir la fosforilación de STAT3 y mantener regulado a la Mcl-1 (Zam y Khadour, 2017).

El mejor modelo de la crisina obtenido en el acoplamiento con la enzima 5IWG, evidenció valores de interacción relativamente altos, con una energía libre de unión de  $8.14 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $1.08 \mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.43$ . Teniendo en cuenta que la actividad de este ligando ya se ha evaluado frente a un

grupo de enzimas HDACs, este resultado sugiere su posible actividad sobre las HDAC-2. Semejante resultado se obtuvo con su homóloga 5IX0, con una energía libre de unión de  $-8.03 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de  $1.29 \mu\text{M}$  y eficiencia del ligando de  $-0.42$ .

A. Lee y Yun (2017) evaluaron *in vitro* los efectos de la **hesperetina** en la secreción de citocinas proinflamatorias a través de la vía de señalización del factor nuclear (NF) $\kappa$ B y los mecanismos epigenéticos subyacentes en monocitos humanos diferenciados de THP-1 tratados con altas concentraciones de glucosa y LPS. Los autores encontraron que las acetilasas de histona (HAT) y las desacetilasas de histona (HDAC) juegan un papel importante en la regulación de varios genes diana inflamatorios y diabéticos al eliminar un grupo acetilo de los residuos de lisina de las proteínas diana. SIRT3 y SIRT6 modulando así el metabolismo de la glucosa y los lípidos.

Este polifenol regula positivamente el factor de transcripción HIF-1  $\alpha$  mientras que regula negativamente el oncogén c-Myc y la catenina- $\beta$  a través de la vía SIRT1. La acción inhibitoria observada sobre la activación de NF- $\kappa$ B por EGCG se ha atribuido a su inhibición de la acetilación de RelA (p65) en lugar de la inhibición directa de la fosforilación de p65. El mecanismo se explicó utilizando células HEK293 en las que EGCG ( $100 \mu\text{M}$ ) eliminó la acetilación de p65 inducida por p300. La hipoacetilación de p65 aumenta el nivel de I $\kappa$ B $\alpha$  citosólico que previene p65. Este flavonoide manifiesta actividad inhibitoria sobre la enzima DNMTi a concentraciones de  $1.2 \mu\text{M/L}$  mediado por la metilación del ADN dependiente de la concentración (Busch *et al.*, 2015; Lewandowska *et al.*, 2016).

El mejor modelo obtenido del acoplamiento entre la hesperetina y la enzima 5IWG fue el de mayor fuerza de interacción teniendo en cuenta las variables evaluadas. La energía libre de unión fue de  $-8.53 \text{ Kcal/mol}$ , con una constante de inhibición de  $559.2 \text{ nM}$ . El tamaño molecular de este ligando disminuyó la eficiencia del ligando siendo de  $-0.39 \text{ Kcal/mol}$ ; sin embargo, este valor se encuentra dentro del parámetro permitido para su selección como posible candidato, siempre teniendo en cuenta las limitaciones de este índice (Meneses y Cuesta, 2015). Este resultado fue semejante al obtenido con la enzima 5IX0, la energía libre de unión fue de  $-8.29 \text{ Kcal/mol}$ , con una constante de inhibición de  $835.2 \text{ nM}$  y la eficiencia del ligando de  $0.38$ .

**El kaempferol** posee múltiples actividades biológicas, como la inhibición del estrés oxidativo y la inducción de la apoptosis, así como la propiedad antiangiogénica. Se ha descrito que inhibe la actividad de la HDAC e incrementa la hiperacetilación de la histona H3, lo que reduce la viabilidad celular y las tasas de proliferación de las líneas celulares de hepatomas y cáncer de colon, HEPG2, HEP3B, HCT-116. En estudios *in silico* con análisis de acoplamiento molecular con esas líneas celulares de cáncer, ha sido reconocido como un inhibidor de HDACs de clase I, II y IV, además se ha demostrado su eficacia como inhibidor de DNMT3a y DNMT3b (Arora *et al.*, 2019; Z. Huang *et al.*, 2016; Lewandowska *et al.*, 2016).

El mejor modelo obtenido en el acoplamiento entre este ligando y la enzima 5IWG alcanzó valores de energía libre de unión de  $-8.45 \text{ Kcal/mol}$ , con una constante de

inhibición de 640.8 nM y eficiencia del ligando de -0.42. En el caso del mejor modelo obtenido con la enzima 5IX0, los valores resultaron ligeramente diferentes, con  $-8.16 \text{ Kcal/mol}$  de energía libre de unión, constante de inhibición de 1.04  $\mu\text{M}$  y la eficiencia del ligando fue de -0.39.

Mucho de los estudios realizados con la **miricetina**, evidencian la actividad que posee para inhibir la acción de la DNMT en líneas celulares de cáncer de mama (Busch *et al.*, 2015). En un estudio con nanoliposomas con miricetina (MYR-NL) para evaluar su eficacia en el tratamiento contra el cáncer mediante el empleo de la línea celular GBM DBTRG-05MG, mostraron una potente inhibición de la proliferación y regularon de los niveles de proteínas relacionadas con el metabolismo glucolítico y la supervivencia celular. Adicionalmente, SIRT3 y p53 fosforilado también estaban regulados negativamente por MYR-NL, lo que indica que MYR-NL inhibió el crecimiento de células GBM a través de PI3K / Akt-ERK mediada por SIRT3 / p53 y vías mitocondriales (Wang *et al.*, 2018).

El mejor modelo de este polifenol acoplado a la enzima 5IWG mostró una energía libre de unión de  $-8.45 \text{ Kcal/mol}$ , con una constante de inhibición de 640.8 nM y eficiencia del ligando de -0.42. Sin embargo, con la enzima 5IX0, el mejor modelo obtuvo valores moderadamente distintos, la energía libre de unión fue de  $-8.05 \text{ Kcal/mol}$ , 1.03  $\mu\text{M}$  de constante de inhibición y -0.40 de eficiencia del ligando. A pesar de las diferencias entre estas enzimas, los valores de interacción obtenidos en el acoplamiento fueron relativamente altos.

Kedhari Sundaram *et al.* (2019) realizaron un estudio con la **quercetina** para investigar su potencial efecto como modulador de las vías epigenéticas para las estrategias contra el cáncer. Se evaluó mediante la actividad bioquímica de las metiltransferasas de ADN (DNMT), las desacetilasas de histonas (HDAC), las metiltransferasas de histonas (HMT) y la metilación del ADN genómico global. En un ensayo basado en inmunosorbente ligado a enzimas se cuantificaron células HeLa tratadas con quercetina. La modulación inducida por quercetina de los modificadores de la cromatina, incluidos DNMT, HDAC, histona acetiltransferasas (HAT) y HMT, y TSG se evaluaron mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). Se descubrió que la quercetina modula la expresión de varios modificadores de la cromatina y disminuyó la actividad de DNMT, HDAC y HMT de una manera dependiente de la dosis. La quercetina regula los niveles de metilación del ADN global de una manera dependiente de la dosis y el tiempo.

El mejor modelo en el acoplamiento con la enzima 5IWG, mostro una energía libre de unión de  $-8.47 \text{ Kcal/mol}$  con una constante de inhibición de 614.4nM y eficiencia del ligando de 0.38. Mientras que los resultados con 5IX0 fueron ligeramente menores. Energía libre de unión  $-8.24 \text{ Kcal/mol}$ , constante de inhibición de 917.8 nM y -0.37 de eficiencia del ligando. Estos valores de interacción son relativamente altos. La presencia de una eficiencia moderadamente baja de -0.38 y -0.37 es indicativo de que el tamaño molecular de la quercetina pudiera causar algún problema en su desplazamiento para establecer la unión con el sitio activo.

Las evidencias obtenidas en el acoplamiento molecular con las enzimas 5IWG y 5IX0 fueron bastante homogéneos entre los ligandos utilizados. A pesar de que las

menores eficiencias de enlaces en la hesperetina y la quercetina no resultaron tan altas como las restantes, los valores fueron aceptables. Sin embargo, es necesario realizar estudios *in vitro*, para confirmar estos resultados.

En las tablas 16 y 17 se muestran las interacciones hidrofóbicas más frecuentes entre los aminoácidos con cada modelo de ligando escogido. En la figura 27 se encuentra el ligando de referencia con su enzima (5IWG) en 2D y 3D, mientras que en la figura 28 se agrupan todos los ligandos incluidos el de referencia, permitiendo apreciar las posiciones de los ligandos en el acoplamiento molecular con respecto al de referencia. En las figuras 29-33 se observan las interacciones hidrofóbicas y de enlace de hidrógeno establecidas entre los ligandos y la enzima 5IWG.

De los 16 aminoácidos de la enzima 5IWG que tuvieron interacción hidrofóbica con los cinco mejores modelos de los fenoles, al compararlos con el ligando de referencia, 11 coincidieron en su interacción, mientras que dos mostraron otra interacción, tres mostraron una interacción diferente y solo dos no interactuaron en dicho ligando. Las interacciones más frecuentes establecidas entre los mejores modelos de los cinco ligandos con los aminoácidos fueron: cinco con Cisteína (156), Glicina (154 y 305), Histidina (146), Leucina (114) y Metionina (35), cuatro con Glicina (306) y Tirosina (308) y tres con Arginina (39) y Fenilalanina (155).

Muy semejante fue el resultado obtenido para la enzima 5IX0, de los 15 aminoácidos que tuvieron interacción hidrofóbica con los cinco mejores modelos de los fenoles, al compararlos con el ligando de referencia, 11 coincidieron en su interacción, mientras que dos mostraron otra interacción y solo dos no interactuaron. Las interacciones más frecuentes establecidas entre los mejores modelos de los cinco ligandos con los aminoácidos fueron: cinco con Cisteína (156), Glicina (154 y 305), Histidina (146), Leucina (114) y Metionina (35), cuatro con Glicina (306) y Tirosina (308) y tres con Fenilalanina (155) y Tirosina (29).

De los 13 aminoácidos de la enzima 5IWG que manifestaron interacción por enlace de H con los mejores modelos obtenido de los cinco fenoles, al compararlo con el ligando de referencia, cuatro coincidieron en su interacción, cuatro mostraron una interacción diferente y cinco no interactuaron. Las interacciones por enlace de H más frecuentes establecidas entre los modelos de los cinco ligandos y los aminoácidos fueron: cinco con Histidina (145 y 183), cuatro con Ácido glutámico (265) y tres con Glicina (143).

Ligeramente diferente resultó con la enzima 5IX0, de los 12 aminoácidos que manifestaron interacción por enlace de H con los mejores modelos obtenido de los cinco fenoles, al compararlo con el ligando de referencia, tres coincidieron en su interacción, seis manifestaron una interacción diferente y tres no interactuaron en dicho logando. Las interacciones por enlace de H más frecuentes establecidas entre los modelos de los cinco ligandos y los aminoácidos fueron: cinco con Histidina (183), cuatro con Histidina (145) y tres con Glicina 143.

Los resultados obtenidos en el acoplamiento para la enzima HDAC han resultado prometedores, si bien no han sido los que han tenido los mayores valores de interacción, como se muestran en la figura 28, han tenido una alta fidelidad en la

posición ocupada en cuanto al ligando de referencia, solapándolo en su totalidad, evidenciándose en el caso de las interacciones hidrofóbicas. Mientras que las interacciones por enlaces de hidrogeno fueron menos semejantes.

Tabla 15: Parámetros evaluados en el acoplamiento entre los mejores modelos de cada ligando con las enzimas HDAC 5IWG Y 5IX0

Ligando	Tc	HDAC 5IWG		EL	HDAC 5IX0		LE
		$\Delta G$ (Kcal/mol)	Ki	kcal/mol/ atom	$\Delta G$ (Kcal/mol)	Ki	kcal/mol/ atom
Crisina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	0.86	-8.14	1.08 $\mu$ M	-0.43	-8.03	1.29 $\mu$ M	-0.42
Hesperetina C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0.91	-8.53	559.2 nM	-0.39	-8.29	835.2 nM	-0.38
Kaempferol C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	0.86	-8.45	641.9 nM	-0.40	-8.16	1.04 $\mu$ M	-0.39
Miricetina C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	0.86	-8.45	640.8 nM	-0.42	-8.05	1.03 $\mu$ M	-0.40
Quercetina C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	0.86	-8.47	614.4 nM	-0.38	-8.24	917.8 nM	-0.37

Tabla 16: Ligandos agrupados por las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de la enzima HDAC 5IWG marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Leu-144, Cys-156, Gly-154, Gly-305, His-146 y Met-35	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Gly-306 y Tyr-308	4	Crisina, Hesperetina, Miricetina, Quercetina
Arg-39 y Phe-155	3	Crisina, Hesperetina, Quercetina
Gly-143 y Tyr-29	2	Crisina, Hesperetina
Ala-141	1	Quercetina
Leu-276 y Phe-210	1	Kaempferol
Phe-114	1	Hesperetina

Tabla 17: Ligandos agrupados por las interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de la enzima HDAC 5IX0, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
Cys-156, Gly-154, Gly-305, His-146, Leu-144, Met-35	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Gly-306 y Tyr-308	4	Crisina, Hesperetina, Miricetina, Quercetina
Phe-155 y Tyr-29	3	Crisina, Hesperetina, Quercetina
Gly-143	2	Crisina, Hesperetina
Phe-114	2	Hesperetina, Miricetina
Ala-141	1	Quercetina
Arg-39	1	Hesperetina
Tyr-308	1	Kaempferol

Tabla 18: Ligandos agrupados por las interacciones por enlace de H con los aminoácidos de la enzima HDAC 5IWG, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
His-145 y His-183	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Gln-265	4	Crisina, Hesperetina, Miricetina, Quercetina
Gly-143	3	Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Ala-141	2	Hesperetina, Miricetina
Phe-155	2	Kaempferol, Miricetina
Arg-39, Asp-269 y Tyr-29	1	Miricetina
Asp-181, Gly-306 y Tyr-308	1	Kaempferol
Gly-142	1	Hesperetina

Tabla 19 Ligandos agrupados por las interacciones por enlace de H con los aminoácidos de la enzima HDAC 5IX0, marcado de color rojo se encuentran los aminoácidos que coinciden con el ligando de referencia

Aminoácidos	Total	Ligandos
His-183	5	Crisina, Hesperetina, Kaempferol, Miricetina, Quercetina
His-145	4	Crisina, Hesperetina, Miricetina, Quercetina
Gly-143	3	Kaempferol, Miricetina, Quercetina
Ala-141	2	Hesperetina, Miricetina
Arg-39	2	Miricetina, Quercetina
Asp-181	2	Hesperetina, Kaempferol
Phe-155	2	Kaempferol, Miricetina
Gln-265 y Tyr-29	1	Miricetina
Gly-142	1	Hesperetina
Gly-306 y Tyr-308	1	Kaempferol

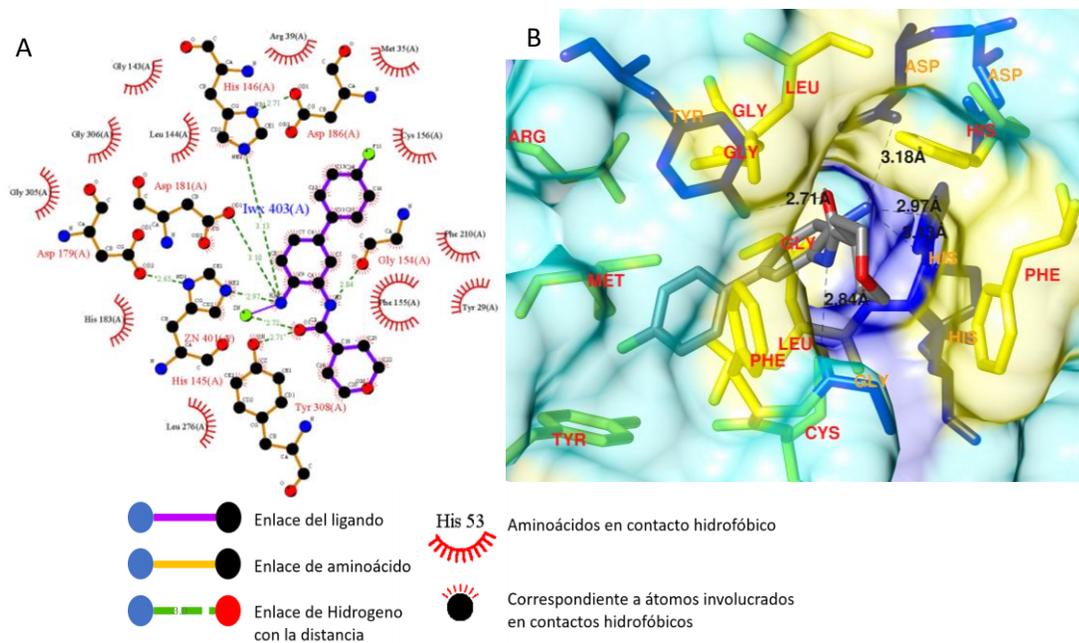


Figura 27. Representación en 2D (A) y 3D (B) del ligando de referencia (K01) en interacción con la enzima HDAC 5IWG

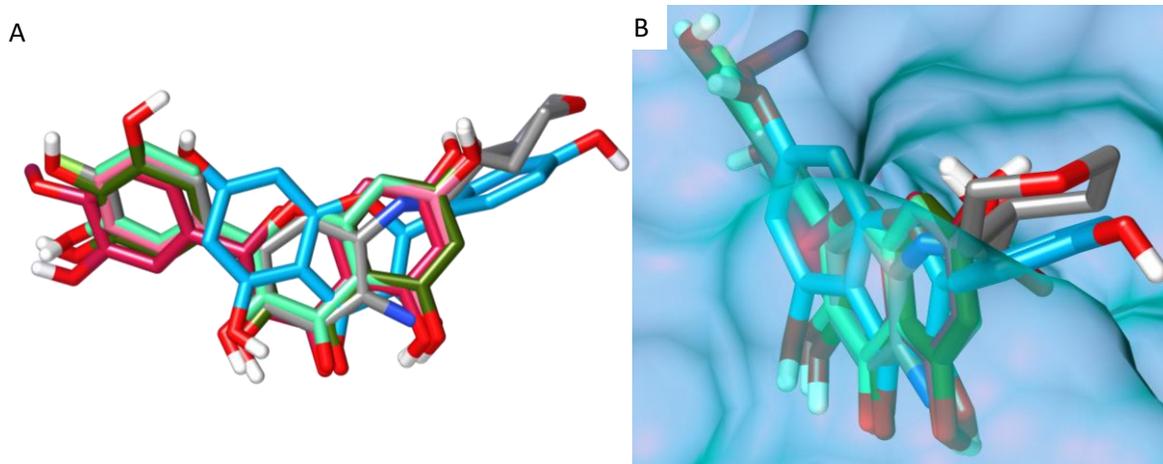


Figura 28. Representación en 3D (A) de todos los ligandos con el de referencia sin la enzima HDAC, (B) con la enzima HDAC. Solo los carbonos diferencian a los ligandos, en el de referencia son gris y en los ligandos fenólicos se seleccionó de manera aleatoria.

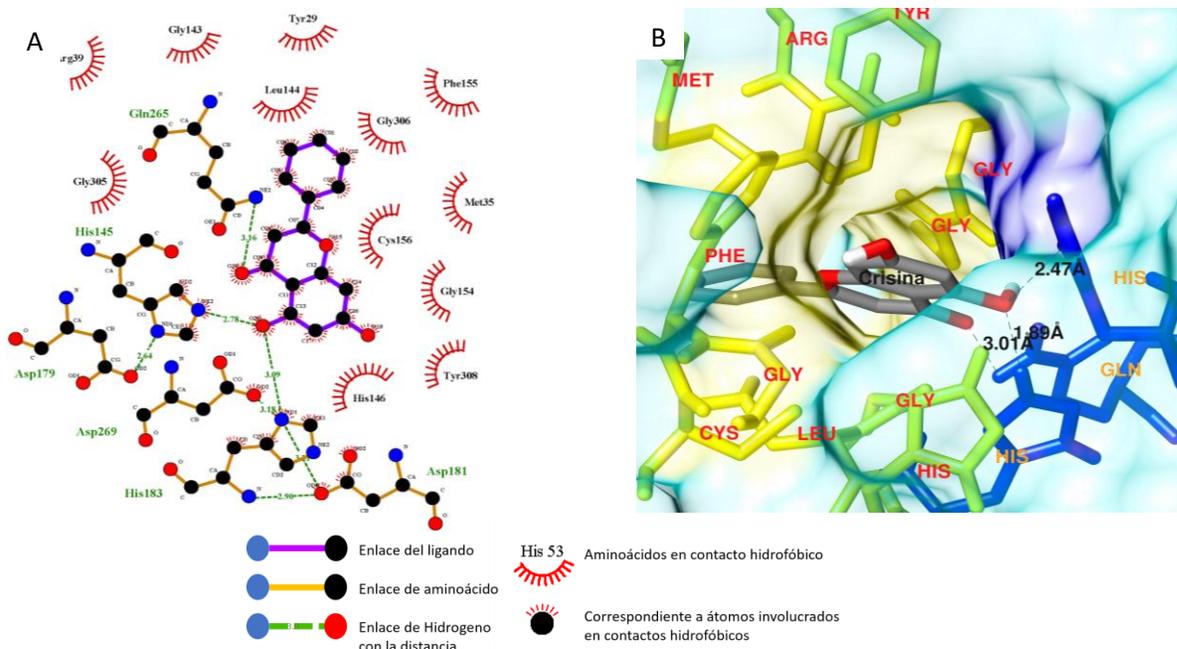


Figura 29. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la crisina. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La crisina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

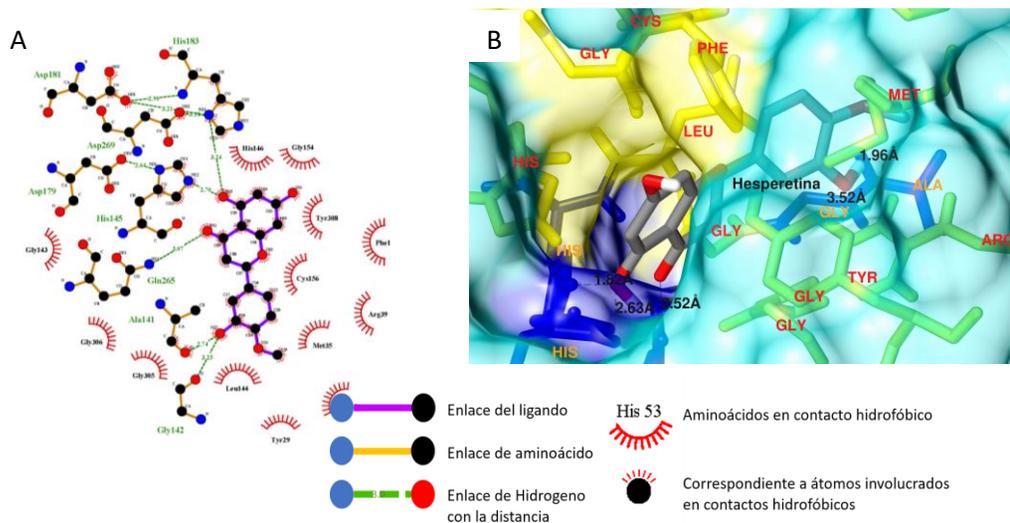


Figura 30. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la hesperetina. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La hesperetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

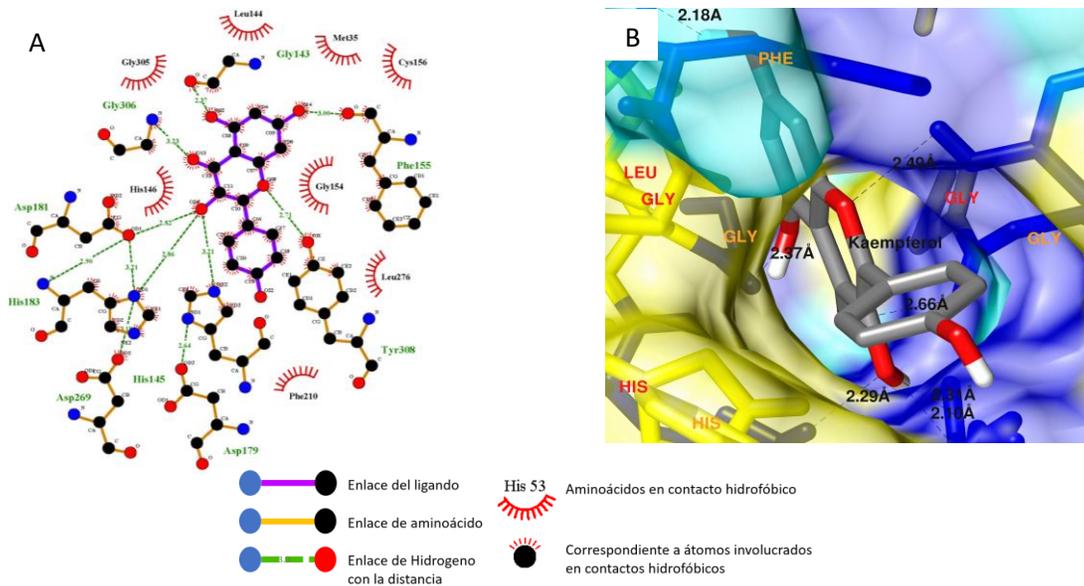


Figura 31. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo del kaempferol. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). El kaempferol que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

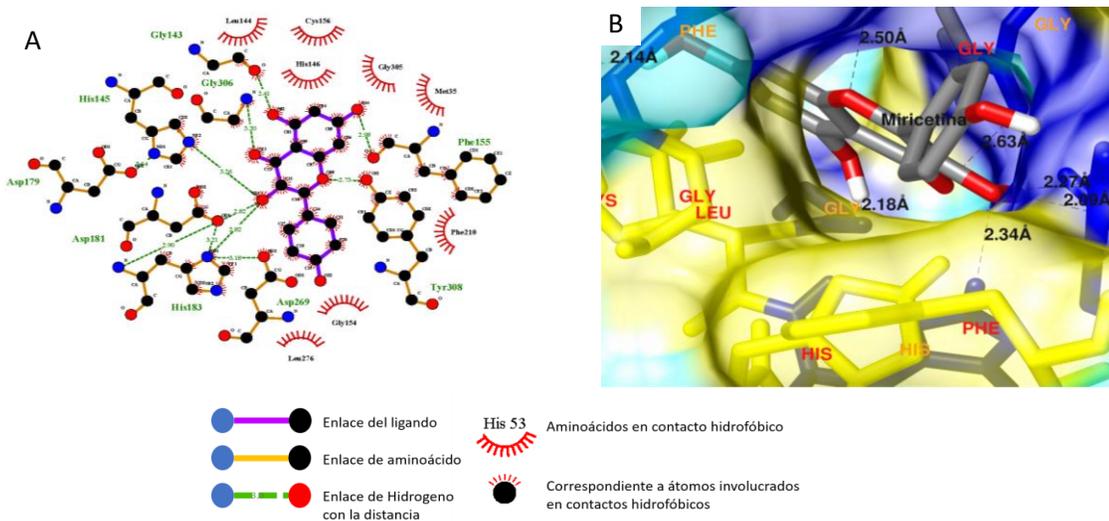


Figura 32. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la miricetina. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La miricetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

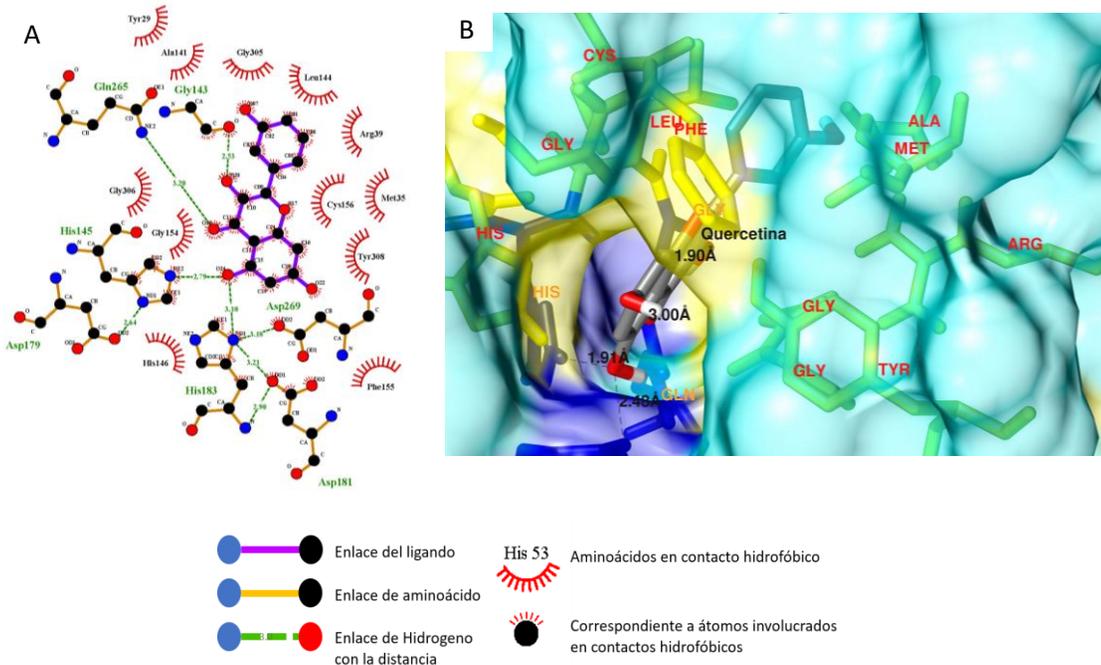


Figura 33. Representación en 2D (A) y 3D (B) del mejor modelo de la quercetina. En 3D, se representa de color cian la enzima, de color amarillo a las interacciones hidrofóbicas (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color rojo), azul los enlaces de H (los nombres de los aminoácidos involucrados están de color naranja). La quercetina que está acoplada a la enzima, los colores de sus átomos representan los elementos que contiene, gris carbono, rojo oxígeno y blanco hidrógeno

## Conclusiones

La fortaleza de unión establecida en el acoplamiento molecular entre los fenoles derivados de setas comestibles-medicinales y las enzimas HDAC, HAT y DNMT evidencio la alta probabilidad de ocurrencia de dicha interacción y en consecuencia la potencialidad de modular eventos epigenéticos.

Todos los modelos derivados del acoplamiento molecular mostraron resultados promisorios en términos de energía libre, constante de inhibición y eficiencia de enlace a pesar de las fluctuaciones observadas, se destacan en particular los flavonoides hesperetina en el caso de la DNMT y la HDAC, la miricetina para la HAT.

Los resultados del presente estudio *in silico* de acoplamiento molecular, revisten particular interés para la exploración predictiva de la actividad moduladora de eventos epigenéticos, por compuestos fenólicos presentes en las setas comestibles, con potencial aplicación en las estrategias quimiopreventivas contra el cáncer.

### **Recomendaciones**

Utilizar otras enzimas de las familias de la DNMT, HAT, HDAC que no fueron evaluadas.

Optimizar estos resultados en estudios posteriores de dinámica molecular y utilizar índices como el de eficiencia del ligando lipofílico (LLE).

## Referencias Bibliográficas

- Abad-Zapatero, C., y Metz, J. T. (2005). Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery. *Drug discovery today*, 10(7), 464-469
- Abdul, Q. A., Yu, B. P., Chung, H. Y., Jung, H. A., y Choi, J. S. (2017). Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Archives of Pharmacal Research*, 40(11), 1219-1237
- Aguirre, R., Isabel, Cutiño, L., Miriam, Peña, J., Morris, H., J, Beltran, Y., Llaurado, G., *et al.* (2018). An in silico approach for evaluating the antitumor and epigenetic modulating potential of phenolic compounds occurring in edible and medicinal mushrooms. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 5(1), 6
- Arora, I., Sharma, M., y Tollefsbol, T. O. (2019). Combinatorial Epigenetics Impact of Polyphenols and Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4567
- Ayissi, V. B. O., Ebrahimi, A., y Schluesenner, H. (2014). Epigenetic effects of natural polyphenols: A focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(1), 22-32
- Bajusz, D., Rácz, A., y Héberger, K. (2015). Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics*, 7(1), 20
- Bannister, A. J., y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395
- Beelman, R. B., Kalaras, M. D., y Richie, J. P. J. (2019). Micronutrients and Bioactive Compounds in Mushrooms: A Recipe for Healthy Aging? *Nutrition Today*, 54(1), 16-22
- Beltran-Delgado, Y., Rojas-Vargas, J. A., Morales-Gonzalez, I., y Morris-Quevedo, H. J. (2019). Molecular docking of Pleurotus ostreatus phenolic compounds with redox balance proteins/Acoplamiento molecular de compuestos fenolicos de Pleurotus ostreatus con proteinas del balance redox. *Revista Cubana de Química*, 31(3), NA-NA
- Bender, A., Jenkins, J. L., Scheiber, J., Sukuru, S. C. K., Glick, M., y Davies, J. W. (2009). How Similar Are Similarity Searching Methods? A Principal Component Analysis of Molecular Descriptor Space. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(1), 108-119
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2395-2402
-

- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, 16(1), 6-21
- Bora-Tatar, G., Dayangaç-Erden, D., Demir, A. S., Dalkara, S., Yelekçi, K., y Erdem-Yurter, H. (2009). Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(14), 5219-5228
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56(11), 317-333
- Bueno, M., y Perez-Gonzalez, J. (2017). Perspectivas en genética médica: La nueva genética. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 13
- Busch, C., Burkard, M., Leischner, C., Lauer, U. M., Frank, J., y Venturelli, S. (2015). Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 64
- Carlos-Reyes, Á., López-González, J. S., Meneses-Flores, M., Gallardo-Rincón, D., Ruíz-García, E., Marchat, L. A., *et al.* (2019). Dietary Compounds as Epigenetic Modulating Agents in Cancer. *Frontiers in Genetics*, 10(79)
- Chang, S.-T., y Wasser, S. P. (2012). The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International journal of medicinal mushrooms*, 14(2)
- ChemOffice, C. Cambridge Scientific Computing Inc. *Cambridge, MA, USA*
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., y Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 18(14), 1818-1892
- Díaz-Lagares, A. (2018). Biomarcadores epigenéticos en cáncer: un pilar de la oncología de precisión. *GENÉTICA MÉDICA Y GENÓMICA*
- Gerhauser, C. (2012). Cancer chemoprevention and nutri-epigenetics: state of the art and future challenges *Natural Products in Cancer Prevention and Therapy* (pp. 73-132): Springer.
- Gilbert, E. R., y Liu, D. (2010). Flavonoids Influence Epigenetic-Modifying Enzyme Activity: Structure-Function Relationships and the Therapeutic Potential for Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 17(17), 1756-1768
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R., Dujon, B., Feldmann, H., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567
-

- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., *et al.* (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 686
- Hodges, E., Molaro, A., Dos Santos, Camila O., Thekkat, P., Song, Q., Uren, P. J., *et al.* (2011). Directional DNA Methylation Changes and Complex Intermediate States Accompany Lineage Specificity in the Adult Hematopoietic Compartment. *Mol Cell*, 44(1), 17-28
- Hogeweg, P. (1978). Simulating the growth of cellular forms. *Simulation*, 31(3), 90-96
- Hon, G. C., Rajagopal, N., Shen, Y., McCleary, D. F., Yue, F., Dang, M. D., *et al.* (2013). Epigenetic memory at embryonic enhancers identified in DNA methylation maps from adult mouse tissues. *Nature Genetics*, 45, 1198
- Huang, J., Plass, C., y Gerhauser, C. (2011). Cancer Chemoprevention by Targeting the Epigenome. *Current Drug Targets*, 12(13), 1925-1956
- Huang, Z., Huang, Q., Ji, L., Wang, Y., Qi, X., Liu, L., *et al.* (2016). Epigenetic regulation of active Chinese herbal components for cancer prevention and treatment: A follow-up review. *Pharmacological Research*, 114, 1-12
- Huey, R., y Morris, G. M. (2008). Using AutoDock 4 with AutoDocktools: a tutorial. *The Scripps Research Institute, USA*, 54-56
- Iridoy Zulet, M., Pulido Fontes, L., Ayuso Blanco, T., Lacruz Bescos, F., y Mendioroz Iriarte, M. (2017). Modificaciones epigenéticas en neurología: alteraciones en la metilación del ADN en la esclerosis múltiple. *Neurología*, 32(7), 463-468
- Issa, J.-P. J., y Kantarjian, H. M. (2009). Targeting DNA Methylation. *Clinical Cancer Research*, 15(12), 3938-3946
- Jasek, K., Kubatka, P., Samec, M., Liskova, A., Smejkal, K., Vybohova, D., *et al.* (2019). DNA Methylation Status in Cancer Disease: Modulations by Plant-Derived Natural Compounds and Dietary Interventions. *Biomolecules*, 9(7), 289
- Kanwal, R., Datt, M., Liu, X., y Gupta, S. (2016). Dietary Flavones as Dual Inhibitors of DNA Methyltransferases and Histone Methyltransferases. *PLOS ONE*, 11(9), e0162956
- Kedhari Sundaram, M., Hussain, A., Haque, S., Raina, R., y Afroze, N. (2019). Quercetin modifies 5'CpG promoter methylation and reactivates various tumor suppressor genes by modulating epigenetic marks in human cervical cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 18357-18369
-

- Khan, S. I., Aumswan, P., Khan, I. A., Walker, L. A., y Dasmahapatra, A. K. (2012). Epigenetic Events Associated with Breast Cancer and Their Prevention by Dietary Components Targeting the Epigenome. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1), 61-73
- Kuska, B. (1998). Beer, Bethesda, and biology: how "genomics" came into being: Oxford University Press.
- Lasko, L. M., Jakob, C. G., Edalji, R. P., Qiu, W., Montgomery, D., Digiammarino, E. L., *et al.* (2017). Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours. *Nature*, 550(7674), 128-132
- Lee, A., y Yun, J.-M. (2017). Hesperetin Inhibits Pro-inflammatory Cytokine Secretion Induced by Lipopolysaccharide in Differentiated Human THP-1 Monocytes under Hyperglycemic Conditions. *The FASEB Journal*, 31(1\_supplement), lb339-lb339
- Lee, M., Son, M., Ryu, E., Shin, Y. S., Kim, J. G., Kang, B. W., *et al.* (2015). Quercetin-induced apoptosis prevents EBV infection. *Oncotarget*, 6(14), 12603-12624
- León, I. E., Díez, P., Etcheverry, S. B., y Fuentes, M. (2016). Deciphering the effect of an oxovanadium (iv) complex with the flavonoid chrysin (VOChrys) on intracellular cell signalling pathways in an osteosarcoma cell line. *Metallomics*, 8(8), 739-749
- Lewandowska, H., Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stępkowski, T. M., y Brzóska, K. (2016). The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 32, 1-19
- Link, A., Balaguer, F., y Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1771-1792
- Liu-Smith, F., y Meyskens, F. L. (2016). Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(6), 1264-1274
- Liu, X., Wang, L., Zhao, K., Thompson, P. R., Hwang, Y., Marmorstein, R., *et al.* (2008). The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature*, 451(7180), 846-850
- Lounkine, E., Wawer, M., Wassermann, A. M., y Bajorath, J. r. (2010). SARANEA: a freely available program to mine structure– activity and structure– selectivity relationship information in compound data sets. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(1), 68-78
-

- Ma, F., y Zhang, C.-y. (2016). Histone modifying enzymes: novel disease biomarkers and assay development. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16(3), 297-306
- Mckee, T., y Mckee, J. R. (2014). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida* (M. E. A. Martínez y A. H. Chong, Trans. 5 ed.).
- Méndez-Lucio, O., Naveja, J. J., Vite-Caritino, H., Prieto-Martínez, F. D., y Medina-Franco, J. L. (2016). Review. One Drug for Multiple Targets: A Computational Perspective. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60, 168-181
- Meneses, L., y Cuesta, S. (2015). Determinación Computacional de la Afinidad y Eficiencia de Enlace de Antiinflamatorios No Esteroides Inhibidores de la Ciclooxygenasa-2. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(1-2), 17-25
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., *et al.* (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16), 2785-2791
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- Murray, C. W., Erlanson, D. A., Hopkins, A. L., Keserü, G. M., Leeson, P. D., Rees, D. C., *et al.* (2014). Validity of Ligand Efficiency Metrics. *ACS medicinal chemistry letters*, 5(6), 616-618
- Nelson, D., y Cox, M. (2009). *Lehninger principles of biochemistry* 5th edition (London: McMillan).
- Paluszczak, J., Krajka-Kuźniak, V., y Baer-Dubowska, W. (2010). The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 192(2), 119-125
- Pérez-Villanueva, J., Romo-Mancillas, A., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Hernández-Luis, F., y Castillo, R. (2011). Antiprotozoal activity of proton-pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(24), 7351-7354
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., *et al.* (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612
-

- Prieto-Martínez, F. D., y Medina-Franco, J. L. (2019). Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 124-134
- Reuter, S., Gupta, S. C., Park, B., Goel, A., y Aggarwal, B. B. (2011). Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. *Genes & Nutrition*, 6(2), 93-108
- Reynolds, C. H., y Holloway, M. K. (2011). Thermodynamics of ligand binding and efficiency. *ACS medicinal chemistry letters*, 2(6), 433-437
- Rodwell, V. W. (2015). *Harper: bioquímica ilustrada*: McGraw-Hill.
- Royse, D. J., Baars, J., y Tan, Q. (2017). Current Overview of Mushroom Production in the World *Edible and Medicinal Mushrooms* (pp. 5-13).
- Russo, G. L., Vastolo, V., Ciccarelli, M., Albano, L., Macchia, P. E., y Ungaro, P. (2017). Dietary polyphenols and chromatin remodeling. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), 2589-2599
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., y Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación química*, 28, 51-58
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46
- Schnekenburger, M., Dicato, M., y Diederich, M. (2014). Plant-derived epigenetic modulators for cancer treatment and prevention. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1123-1132
- Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517, 321
- Selzer, P. M., Marhöfer, R. J., y Koch, O. (2018). *Applied Bioinformatics: An Introduction*: Springer.
- Shankar, E., Kanwal, R., Candamo, M., y Gupta, S. (2016). Dietary phytochemicals as epigenetic modifiers in cancer: Promise and challenges. *Seminars in Cancer Biology*, 40-41, 82-99
- Shivakumar, P., y Krauthammer, M. (2009). Structural similarity assessment for drug sensitivity prediction in cancer. *BMC Bioinformatics*, 10(9), S17
- Sipl, W., Jung, M., Mannhold, R., Buschmann, H., y Holenz, J. (2019). *Epigenetic drug discovery*. Wiley Online Library.
-

- Spyrakis, F., y Cavasotto, C. N. (2015). Open challenges in structure-based virtual screening: Receptor modeling, target flexibility consideration and active site water molecules description. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 583, 105-119
- Stadler, M. B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Schöler, A., *et al.* (2011). DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature*, 480, 490
- Stevens, E. (2014). *Medicinal chemistry: the modern drug discovery process*.
- Thakur, V. S., Deb, G., Babcook, M. A., y Gupta, S. (2014). Plant Phytochemicals as Epigenetic Modulators: Role in Cancer Chemoprevention. *The AAPS Journal*, 16(1), 151-163
- Tripathi, S. S. (2018). Epigenetic Changes in Aging and Modulation by Dietary Nutrients. In S. I. Rizvi y U. Çakatay (Eds.), *Molecular Basis and Emerging Strategies for Anti-aging Interventions* (pp. 253-265). Singapore: Springer Singapore.
- Upadhyay, A. K., y Cheng, X. (2011). Dynamics of histone lysine methylation: structures of methyl writers and erasers. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 67, 107-124
- Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., y Vivas-Reyes, R. (2013). Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*, 42(1), 101-124
- Vellore, N. A., y Baron, R. (2014). Epigenetic Molecular Recognition: A Biomolecular Modeling Perspective. *ChemMedChem*, 9(3), 484-494
- Virshup, A. M., Contreras-García, J., Wipf, P., Yang, W., y Beratan, D. N. (2013). Stochastic voyages into uncharted chemical space produce a representative library of all possible drug-like compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 135(19), 7296-7303
- Wagner, F. F., Weiwer, M., Steinbacher, S., Schomburg, A., Reinemer, P., Gale, J. P., *et al.* (2016). Kinetic and structural insights into the binding of histone deacetylase 1 and 2 (HDAC1, 2) inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 24(18), 4008-4015
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., y Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering, design and selection*, 8(2), 127-134
-

- Wang, G., Wang, J.-J., Wang, Y.-Z., Feng, S., Jing, G., y Fu, X.-L. (2018). Myricetin nanoliposomes induced SIRT3-mediated glycolytic metabolism leading to glioblastoma cell death. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup3), S180-S191
- Zam, W., y Khadour, A. (2017). Impact of Phytochemicals and Dietary Patterns on Epigenome and Cancer. *Nutrition and Cancer*, 69(2), 184-200
- Zhang, Z.-M., Lu, R., Wang, P., Yu, Y., Chen, D., Gao, L., *et al.* (2018). Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation. *Nature*, 554(7692), 387-391
-