



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
QUÍMICA MEDICINAL

**“EVALUACIÓN *IN SILICO* DE DERIVADOS DE COMPUESTOS ANTIINFLAMATORIOS
DISEÑADOS A PARTIR DE COMBRETASTATINA A4”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

I.B.Q. Marcos Quiroz López

2183804419

COMITÉ TUTORIAL

Tutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Asesor: Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa

Asesor: Dr. Ignacio González Sánchez

diciembre, 2021

Evaluación *in silico* de derivados de compuestos antiinflamatorios diseñados a partir de combretastatina A4

Vo.Bo. del Comité tutorial

Tutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva _____



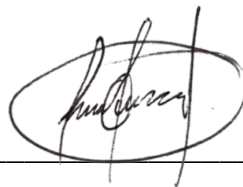
Asesor: Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa _____



Asesor: Dr. Ignacio González Sánchez _____



Alumno

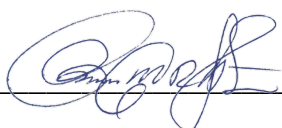


Marcos Quiroz López

Matrícula: 2183804419

Evaluación *in silico* de derivados de compuestos antiinflamatorios diseñados a partir de combretastatina A4

JURADO



Presidente: Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas



Vocal: Dr. Abraham Madriaga Mazón



Secretario: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, para contrarrestar la mortalidad por esta enfermedad se utilizan diferentes tipos de terapias, siendo la quimioterapia una de las más usadas. Sin embargo, los problemas de resistencia o presencia de efectos adversos complican la exitosa función de este tipo de terapia, debido a esta situación, es de suma importancia hacer la búsqueda de nuevos fármacos que pudiesen desarrollarse a largo plazo como agentes quimioterapéuticos. En el presente trabajo, se realizó la evaluación *in silico* de quince derivados híbridos de antiinflamatorios no esteroideos y el producto natural combretastatina A4. Se realizó la búsqueda de potenciales blancos terapéuticos relacionados con cáncer, así como el cálculo de propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de estos híbridos para predecir la tendencia a ser buenos candidatos para convertirse en fármacos; adicionalmente, se llevó a cabo el acoplamiento molecular con los blancos terapéuticos identificados (tubulina, aldol cetoreductasa familia 1 miembro 3, ciclooxigenasa 1 y ciclooxigenasa 2). Se determinó que la serie de derivados híbridos de ibuprofeno y combretastatina A4 (**10–12**) podrían presentar una mejor afinidad sobre el sitio de unión de la colchicina sobre la proteína tubulina, además podrían presentar afinidad por los sitios activos de los otros tres blancos identificados. Por lo anterior, se estudiaron estrategias de síntesis basadas en experimentos preliminares, para proponer una ruta de síntesis viable de estos derivados de ibuprofeno y poder realizar estudios posteriores *in vitro* e *in vivo* evaluando la capacidad citotóxica y anticancerosa de estas moléculas.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, a su programa de posgrado de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y al laboratorio de Síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas (N-015) por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación para obtener el grado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para la realización del presente proyecto. CVU **930035**

A mi tutor Dr. Jaime Pérez Villanueva, a mis asesores Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa y el Dr. Ignacio González Sánchez, por su orientación y apoyo brindados para realizar y culminar el proyecto de investigación.

A mis padres Aurelia López Solís y Marco Antonio Quiroz Martínez por su apoyo incondicional en las metas que me proponga, por su apoyo moral y económico para la culminación del proyecto y de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

A mis hermanas Andrea Rueda López y María Elena Rueda López por su apoyo, consejos y cariño que me brindaron durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos de la vida, en especial a América Adilene León Rosas, Karina Elizabeth Jiménez Camacho, Hugo Manuel Mora Rodríguez y Diego Mora Rodríguez por estar para mí siempre que lo necesité, por sus consejos, por su apoyo y por todo el cariño recibido.

A mis amigos y compañeros de la maestría y del laboratorio Lucia Rojas Gonzáles, Edgar Salazar Quintana, Viridiana Villanueva Castillo, Masha Burelo, Lucelya Carvalho, Diana M. Roldan, Lucero R. García, Karen Rodríguez Villar y Martha Leyte Lugo por los buenos momentos que pasamos juntos en esta etapa, por los consejos y apoyo brindados.

Índice general

Índice de esquemas	viii
Índice de imágenes	ix
Índice de tablas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	1
2.1. <i>Cáncer</i>	2
2.2. <i>Antiinflamatorios no esteroideos y cáncer</i>	4
2.3. <i>Combretastatina A4 como agente anticancerígeno</i>	6
2.4. <i>Diseño molecular</i>	6
2.5. <i>Herramientas quimioinformáticas para el descubrimiento de nuevos fármacos</i>	7
3. Marco Teórico	9
3.1. <i>Quimioterapia</i>	9
3.2. <i>Microtúbulos como blancos terapéuticos</i>	10
3.3. <i>Combretastatina A-4</i>	22
3.4. <i>Ciclooxigenasas</i>	24
3.5. <i>Aldo ceto reductasa 1C familia 3</i>	26
3.6. <i>Antiinflamatorios no esteroideos</i>	26
3.7. <i>Descubrimiento y diseño de fármacos asistido por computadora</i>	28
3.8. <i>Acoplamiento molecular (molecular docking)</i>	31
3.9. <i>Quimioinformática</i>	34
3.10. <i>Descriptores moleculares y predicción de propiedades fisicoquímicas</i>	35
3.10.1. <i>SwissADME</i>	36
3.10.2. <i>OSIRIS</i>	37
3.10.3. <i>PASS Online</i>	37
3.10.4. <i>SwissTargetPrediction</i>	37
4. Planteamiento del problema.....	38
5. Hipótesis.....	39
6. Objetivos	39
6.1. <i>Objetivo general</i>	39

6.2. Objetivos específicos	39
7. Materiales y métodos	40
7.1. Identificación de blancos terapéuticos de AINEs y combretastatina A4, involucrados en la carcinogénesis	40
7.2. Predicción de blancos terapéuticos de derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4, involucrados en la carcinogénesis.....	40
7.3. Predicción de propiedades de los derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4	40
7.4. Acoplamiento molecular	41
7.5. Estudios preliminares de síntesis química	42
8. Resultados y discusión.....	43
8.1. Identificación de blancos terapéuticos de AINEs y combretastatina A4, involucrados en la carcinogénesis	43
8.2. Predicción de blancos terapéuticos de derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4, involucrados en la carcinogénesis.....	45
8.3. Predicción de propiedades de los derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4	46
8.3.1. SwissADME	46
8.3.2. OSIRIS DataWarrior	58
8.4. Acoplamiento molecular.....	62
8.4.1. Acoplamiento molecular dirigido al sitio de colchicina de la α/β -tubulina	63
8.4.2. Acoplamiento molecular con AKR1C3.....	74
8.4.3. Acoplamiento molecular con COX-1	84
8.4.4. Acoplamiento molecular con COX-2	94
8.4.5. Acoplamiento molecular dirigido a los distintos sitios de la tubulina con AutoDock Vina	104
8.5. Síntesis química.....	112
8.5.1. Exploración de metodologías de síntesis.....	112
8.5.2. Síntesis de derivados de ácido mefenámico y propuesta de síntesis para los derivados 10–12.....	114
9. Conclusiones.....	124
10. Referencias	126
11. Anexos	136

Índice de esquemas

Esquema 1. Diseño de los compuestos para la evaluación <i>in silico</i>	7
Esquema 2. Estrategia de síntesis para los derivados 4-12	112
Esquema 3. Condiciones de reacción utilizadas para la síntesis de las moléculas 4 y 5	115
Esquema 4. Ruta de síntesis propuesta para los derivados de ibuprofeno 10-12	123

Índice de imágenes

Imagen 1. Estructura del dímero α/β -tubulina.....	11
Imagen 2. Dinámica de microtúbulos.....	13
Imagen 3 Sitio de taxol en el dímero α/β -tubulina.....	15
Imagen 4 Sitio de laulimalida/pelorusida en el dímero α/β -tubulina	16
Imagen 5 Sitio de colchicina en el dímero α/β -tubulina.....	18
Imagen 6 Sitio de los alcaloides de la vinca en el dímero α/β -tubulina.....	19
Imagen 7 Sitio de la maitansina en el dímero α/β -tubulina.....	20
Imagen 8 Sitio de pironetina en el dímero α/β -tubulina.....	21
Imagen 9 Estructura del dímero α/β -tubulina y sus diferentes sitios activos.....	22
Imagen 10 Estructura en 2D y 3D de la combretastatina A-4.....	22
Imagen 11 Etapas clásicas en el desarrollo de un medicamento	29
Imagen 12 . Estructura en 2D de la combretastatina A-4 identificando los anillos A y B	65
Imagen 13 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4	67
Imagen 14 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula 10	68
Imagen 15 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula 11	70
Imagen 16 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula 12	72
Imagen 17 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibup	78
Imagen 18 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula 10	79
Imagen 19 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula 11	81
Imagen 20 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula 12	82
Imagen 21 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y el ligando cristalizado Celecoxib	87
Imagen 22 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula 10	89
Imagen 23 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula 11	90
Imagen 24 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula 12	92

Imagen 25 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y el ligando cristalizado AM	97
Imagen 26 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula 10	98
Imagen 27 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula 11	100
Imagen 28 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula 12	102
Imagen 29 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y el ligando cristalizado ciclostreptina	107
Imagen 30 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula 10	108
Imagen 31 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula 11	109
Imagen 32 Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula 12	111
Imagen 33 Espectro de ¹ H RMN de la molécula 4	118
Imagen 34 Espectro de ¹ H RMN de la molécula 5	119
Imagen 35 Espectro de ¹³ C RMN de la molécula 4	121
Imagen 36 Espectro de ¹³ C RMN de la molécula 5	122

Índice de tablas

Tabla 1. Principales características de AINEs empleados como cabeza de serie en el diseño molecular del presente estudio.....	27
Tabla 2. Blancos moleculares encontrados a partir de la revisión bibliográfica.....	44
Tabla 3. Blancos moleculares obtenidos en Swiss Target Prediction y PassOnline.....	45
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de las moléculas 1-15 y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en SwissADME.....	46
Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos de las moléculas 1-15 y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en SwissADME.....	50
Tabla 6. Lipofilia, solubilidad y parámetros químico-medicinales de las moléculas 1-15 y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en SwissADME.....	52
Tabla 7. Parámetros farmacológicos de las moléculas 1-15 y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en OSIRIS.....	59
Tabla 8. Puntuaciones de las moléculas 1-15 obtenidas en OSIRIS.....	62
Tabla 9. Puntuación del acoplamiento molecular con el blanco α/β -tubulina utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y Gold.....	63
Tabla 10. Interacciones reportadas en el sitio de unión de la colchicina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4.....	65
Tabla 11. Interacciones presentes en el sitio de unión de la colchicina entre el ligando cristalizado CA-4 y las moléculas 10-12 con el blanco α/β -tubulina con los programas AutoDock 4.2 y GOLD.....	73
Tabla 12. Puntuación del acoplamiento molecular con el blanco AKR1C3 utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD.....	75
Tabla 13. Interacciones reportadas entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibup.....	77
Tabla 14. Interacciones presentes entre el ligando cristalizado Ibup, las moléculas 10-12 y el blanco AKR1C3 con los programas AutoDock 4.2 y GOLD.....	83
Tabla 15. Puntuación del acoplamiento molecular con el blanco COX-1 utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD.....	85
Tabla 16. Interacciones reportadas entre el blanco molecular COX-1 y AINEs.....	86
Tabla 17. Interacciones presentes entre el ligando cristalizado Celecoxib, las moléculas 10-12 y el blanco COX-1 con los programas AutoDock 4.2 y GOLD.....	93
Tabla 18. Puntuación del acoplamiento molecular con el blanco COX-2 utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD.....	94
Tabla 19. Interacciones reportadas entre el blanco molecular COX-2 y AINEs.....	96
Tabla 20. Interacciones presentes entre el ligando cristalizado AM, las moléculas 10-12 y el blanco COX-2 con los programas AutoDock 4.2 y GOLD.....	103
Tabla 21. Conformaciones obtenidas del acoplamiento molecular en los diferentes sitios activos de	

la tubulina con AutoDock Vina.....	105
Tabla 22. Interacciones reportadas de la ciclostreptina y taxol en el sitio del taxano en la tubulina..	106
Tabla 23. Principales características de las moléculas sintetizadas.....	116
Tabla 24. Señales características del espectro IR de las moléculas obtenidas en cm^{-1}	116
Tabla 25. Señales características de ^1H RMN de las moléculas 3 y 4 obtenidas en ppm.....	117
Tabla 26 Señales características de ^{13}C RMN de las moléculas 3 y 4 obtenidas en ppm.....	120

Lista de abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Ácido mefenámico
AKR1C3	Aldo ceto reductasa familia 1 miembro 3
Å ²	angstroms al cuadrado
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
BHE	Barrera hematoencefálica
cm ⁻¹	centímetros a la menos 1
COX	Ciclooxigenasa
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria media
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
DIFAC	Diseño de Fármacos Asistido por Computadora
ΔG _{Unión}	Energía de unión
GI	Gastrointestinal
°C	grados Celsius
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
Hz	hertz
h	horas
kDa	kilodalton
MeOH	Metanol
mL	mililitros
mmol	milimol

M	molaridad
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	partes por millón
% p/p	Porcentaje peso-peso
pH	Potencial de hidrógeno
PDB	Del inglés: Protein Data Bank
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMSD	Del inglés: Root Mean Square Deviation of atomic positions
SMILES	Del inglés: Simplified Molecular Input Line Entry Specification
TPSA	Del inglés: Topological Polar Surface Area

1. Introducción

El cáncer se caracteriza por un descontrol entre la proliferación y la muerte celular; además de esto, existen diversos tipos de cáncer, mismos que pueden presentar metástasis a otras partes del cuerpo. Su etiología es multifactorial y en ella juegan un papel importante diferentes factores (Herráez A., 2012).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que en 2020 se presentaron alrededor de 10 millones de muertes a causa de esta enfermedad y que esta cifra ha aumentado hasta nuestros días. Dentro de los cánceres de mayor incidencia a nivel mundial, para ambos géneros, se encuentran los de pulmón, seno, colon, próstata, hígado, cervicouterino, entre otros (OMS, 2021).

En México, esta enfermedad es la tercera causa de muerte, 14 de cada 100 mexicanos pierden la vida debido a este padecimiento (SS, 2017). Uno de los principales tratamientos contra el cáncer es la quimioterapia. Sin embargo, es común que los tumores presenten resistencia a los fármacos convencionales.

En la actualidad, se realizan diversos estudios en donde se pretende encontrar nuevos fármacos de utilidad en la quimioterapia contra el cáncer. Sin embargo, debido al origen multifactorial de la enfermedad y su resistencia a fármacos, muchos de estos estudios han presentado resultados poco o nada alentadores.

Por lo anterior, existe una necesidad constante de buscar nuevas moléculas bioactivas que puedan ser una alternativa a los fármacos usados frecuentemente en la clínica. En el presente trabajo se plantea la evaluación *in silico* de nuevos compuestos híbridos diseñados a partir de antiinflamatorios y el producto natural combretastatina A4.

2. Antecedentes

2.1. Cáncer

Durante la existencia de la humanidad se han presentado dificultades para obtener una mayor esperanza de vida, desde las pandemias ocurridas en siglos pasados que poco a poco fueron contrarrestadas con la aparición de los antibióticos, hasta trastornos como el cáncer, que es de los principales problemas de salud en todo el mundo (Lugones M., 2009).

El cáncer, también llamado neoplasia o tumor, es considerado una enfermedad genética que puede llegar a desarrollarse en organismos superiores, hasta la fecha se sabe que la causa de esta enfermedad es multifactorial, ya que esta enfermedad depende en gran medida de los factores epigenéticos que están presentes en cada individuo (Herráez A., 2012).

Según Lugones y Ramírez, la descripción más antigua de esta enfermedad sin utilizar este término data de los años 1600 a.C. aproximadamente y fue descrito en Egipto (Lugones M., 2009).

Uno de los primeros estudios que informan sobre la interacción entre el tumor y el microambiente fue hecho en 1863 por Rudolph Virchow, en donde observó que la infiltración de leucocitos caracterizaba a tumores sólidos (Maman S., 2018).

Por otro lado, al paso de los años, las investigaciones relacionadas con los tumores se han centrado en la comprensión del microambiente en el que está envuelto el tumor. El estudio moderno de este microambiente inició en los años setentas del siglo veinte, cuando científicos pretendían investigar la angiogénesis y el contexto inmune de los tumores como estudios independientes (Maman S., 2018).

Al paso de los años y con el estudio del microambiente del tumor, se han descubierto varios marcadores moleculares y oncogenes de los distintos tipos de cáncer que propician el desarrollo del tumor, en general, ha habido un gran avance en la investigación de esta enfermedad; sin embargo, a pesar de esos avances, esta

enfermedad con sus subtipos, sigue teniendo un alto índice de mortalidad (OMS, 2021).

Para contrarrestar el alto grado de mortalidad se han propuesto varias alternativas, desde la prevención evitando tener contacto con lo que se sabe son factores de riesgo, extirpación del tumor, así como distintos tipos de terapia, como lo son inmunoterapia, hormonoterapia, radioterapia y quimioterapia (Volker S., 2019).

Los inicios de la quimioterapia datan de principios del siglo XX, aunque originalmente este tipo de terapia no era dirigida para cáncer. Tiempo después, en la segunda guerra mundial se observó que personas que eran expuestas a mostaza nitrogenada desarrollaron recuentos de glóbulos blancos significativamente reducidos, por lo que esto permitió hacer estudios en donde se pretendía observar si el contenido de la mostaza podía usarse para inhibir el crecimiento celular descontrolado, como sucede en las células cancerosas. Yale, Gilman y Goodman, en un estudio publicado en 1946, examinaron los efectos terapéuticos de los agentes de mostaza en el tratamiento de linfoma, descubrieron que las masas tumorales se redujeron significativamente en ratones y posteriormente en pacientes, esto marcó el comienzo del uso de agentes citotóxicos para el tratamiento del cáncer (DeVita V., 2008).

Después de que el uso de mostaza nitrogenada ganara popularidad, se realizaron investigaciones con otro enfoque quimioterapéutico. Sindney Farber realizó estudios sobre los efectos anticancerígenos del ácido fólico, su grupo de investigación desarrolló análogos del folato que eran antagonistas de dicho ácido. En 1948, estos análogos se convirtieron en las primeras moléculas que provocaban la rehabilitación en niños con leucemia linfoblástica aguda, lo que demuestra que estas moléculas tienen el potencial de restaurar la médula ósea (Baguley B., 2002).

Posteriormente, Eli Lilly anunciaba que los alcaloides vegetales de la vinca eran beneficiosos para los pacientes con leucemias, introduciendo así a estos compuestos como agentes anticancerígenos en la década de 1960 (Baguley B., 2002).

Durante las siguientes décadas, la quimioterapia en combinación comenzó a ganar popularidad, el uso de medicamentos con diferentes tipos de mecanismos de acción provocó que los pacientes obtuvieran mejoras en su supervivencia, así como una disminución anual en las tasas de mortalidad desde 1990 hasta ahora. Esto se le atribuye tanto a la detección temprana del cáncer, como al tratamiento con agentes quimioterapéuticos (DeVita V., 2008).

2.2. Antiinflamatorios no esteroideos y cáncer

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) ejercen su efecto inhibiendo la enzima ciclooxigenasa (COX) la cual participa en la producción de prostaglandinas en respuesta a ciertas lesiones o enfermedades, causando dolor, hinchazón, inflamación en trastornos musculoesqueléticos, fiebre, entre otros síntomas. Hasta el momento se conocen tres isoformas de COXs, donde la 2 (COX-2) juega un papel importante en el proceso inflamatorio agudo. Existen algunos antiinflamatorios como el celecoxib cuyo efecto es selectivo contra la COX-2, y otros que inhiben de manera similar a las isoformas 1 y 2 (Sobolewski C., 2010).

Por otro lado, como ya se mencionó, el patólogo alemán Rudolf C. Virchow en 1863 observó que algunos cánceres estaban asociados inherentemente con la infiltración de glóbulos blancos; sin embargo, fue hasta finales del siglo XX que un creciente número de investigaciones proponían que la inflamación crónica es una de las características que permiten el desarrollo del cáncer (Pannuziuo A., 2018).

Esto permitió proponer que el cáncer puede originarse en un entorno de inflamación crónica, que a su vez puede ser asociado con infecciones persistentes, daño inmunomediado o una exposición prolongada a irritantes; sin omitir las alteraciones genéticas y epigenéticas, que se sabe, están relacionadas con el proceso de carcinogénesis y modifican la homeostasis del tejido, por lo tanto, pueden inducir a una respuesta inflamatoria crónica (Pannuziuo A., 2018).

Adicionalmente, se conoce que algunas líneas celulares de cáncer sobreexpresan la COX-2 y algunos autores plantean que juega un papel importante en la proliferación de las células tumorales (Tsuji M., 1998).

Se ha reportado un número importante de AINEs que poseen actividad citotóxica frente a líneas tumorales humanas de varios tipos de cáncer. Uno de estos compuestos es el celecoxib que fue reposicionado para el tratamiento de poliposis adenomatosa familiar, una enfermedad hereditaria que evoluciona sin tratamiento a cáncer colorrectal. Otros AINEs también han presentado actividad antitumoral, tales como indometacina, sulindaco, ácido acetilsalicílico, ácido mefenámico y meclofenámico, diclofenaco e ibuprofeno (Soriano A., 2015).

En 2018, El Sayed y colaboradores realizaron una investigación en donde pretendían obtener 20 análogos de Naproxeno [Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoico] para su evaluación citotóxica *in vitro* en sesenta diferentes líneas celulares tumorales, obteniendo sólo cinco compuestos que mostraron una importante inhibición del crecimiento celular a una concentración de 10^{-5} M, así como otros compuestos que fueron selectivos para ciertos tipos de líneas celulares tumorales (El Sayed M., 2018).

En otro estudio publicado en 2019 por Thuy Hang Nguyen y colaboradores, se planteó el diseño, síntesis y la actividad biológica de veintiún derivados de pirazol que presentan sitios farmacóforos del celecoxib y de la combretastatina A-4. Estos compuestos se evaluaron sobre tres líneas celulares tumorales demostrando que la incorporación de los grupos farmacofóricos importantes de esas dos moléculas (celecoxib y combretastatina A-4) en una sola, juega un papel importante en la determinación de una mejor actividad biológica de los nuevos compuestos híbridos (Nguyen T., 2019).

2.3. Combretastatina A4 como agente anticancerígeno

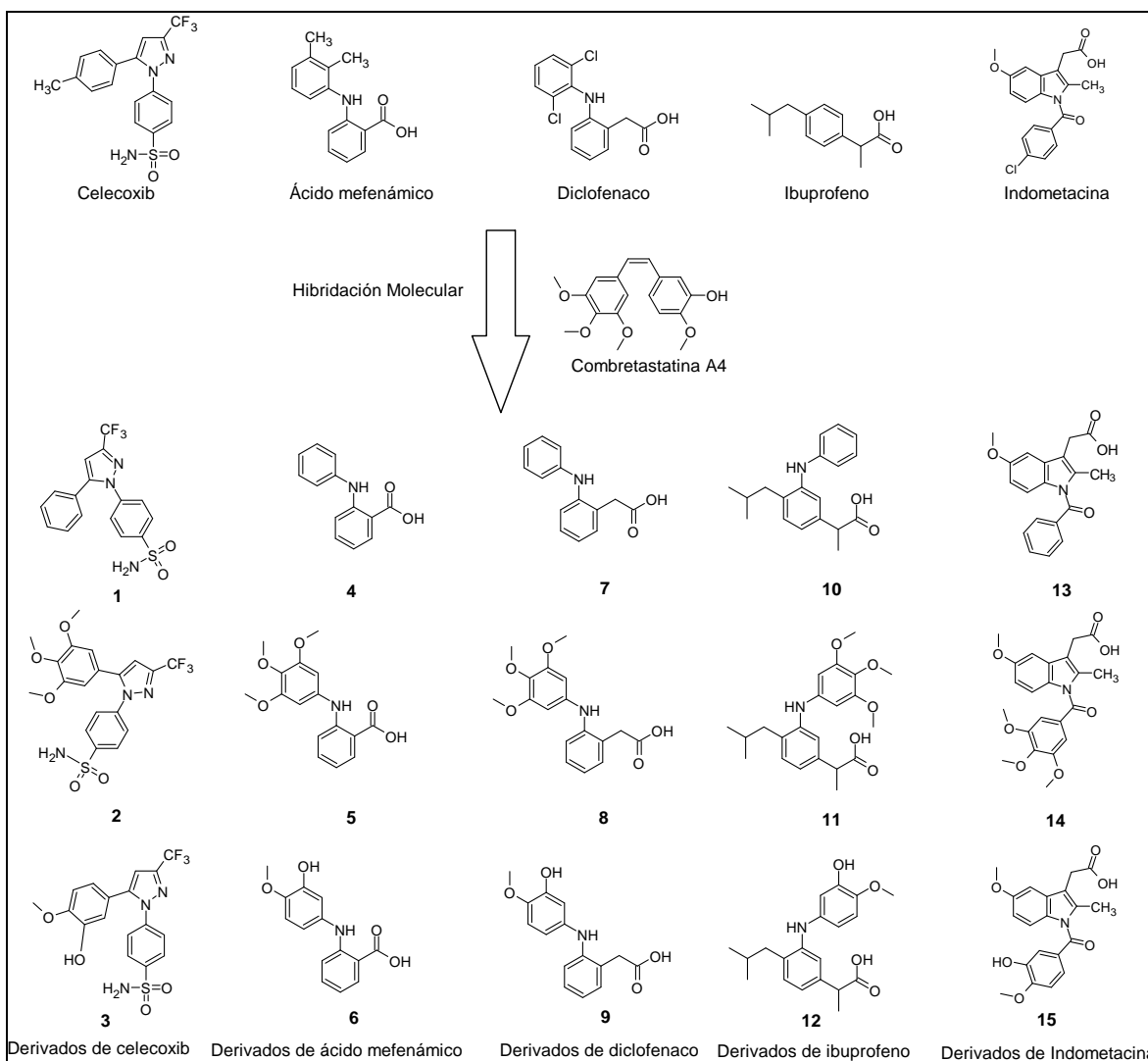
Otros compuestos que también han demostrado ser citotóxicos son las combretastatinas A1 y A4. Estas moléculas inicialmente fueron aisladas de *Combretum caffrum* y poseen un núcleo base de estilbeno (Pettit G., 2005).

Se ha reportado que la combretastatina A4 puede unirse a los microtúbulos, específicamente en el sitio de unión de la colchicina en la β -tubulina. Esta unión inhibe la polimerización de la tubulina provocando que no se formen de manera normal los husos mitóticos y que las células no se puedan dividir, conduciendo así a una muerte celular ya sea por apoptosis o por catástrofe mitótica (McGown A, 1989; Kumar S., 2013; Tron G., 2006).

Adicionalmente, se ha reportado la síntesis de análogos y derivados de combretastatina A4, mismos que han presentado una actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares vía inhibición de la polimerización de la tubulina (Lu Y., 2012).

2.4. Diseño molecular

En el presente trabajo se propone la evaluación *in silico* de quince compuestos diseñados a partir de la estructura de la combretastatina A4 y de algunos AINEs. En el Esquema 1 se muestran las estructuras propuestas por la hibridación de la combretastatina A4 y los AINEs celecoxib (**1**, **2** y **3**), ácido mefenámico (**4**, **5** y **6**), diclofenaco (**7**, **8** y **9**), ibuprofeno (**10**, **11** y **12**), e indometacina (**13**, **14** y **15**). El propósito es contar con moléculas con potencial farmacológico dual, debido a la asociación que existe entre el proceso inflamatorio y cáncer. Además, como ya se mencionó existen reportes acerca de las propiedades anticancerígenas de algunos antiinflamatorios, especialmente celecoxib que ha sido ampliamente estudiado. El efecto antiinflamatorio inherente a los AINEs sumado a la actividad citotóxica observada en los mismos y la potente actividad citotóxica observada en la combretastatina A4, lleva a plantear los compuestos **1–15** como agentes citotóxicos.



Esquema 1. Diseño de los compuestos para la evaluación *in silico*

2.5. Herramientas quimiinformáticas para el descubrimiento de nuevos fármacos

A mediados de la década de los noventa, la comunidad científica argumentaba sobre la aplicación de la informática en la química, convirtiéndola así en una disciplina emergente. Sin embargo, en ese momento ya existían sociedades que incluían la quimiometría, además de existir revistas que incluían el mismo término, como lo fueron la revista *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* y la revista *Journal of Chemometrics*. Por otro lado, el término química informática no estaba presente en revistas científicas ni en sociedades, hasta el año de 2002 en

Japón, en donde se generó la primera revista científica con este término: *The Journal of Computer Chemistry*. Debido a este lanzamiento, el término de química informática o química computacional fue adoptado por diversos investigadores en todo el mundo. Con la utilización de la química informática, se alentó a la apertura de diversos institutos que contenían el término “química informática” en sus nombres, como lo es el *Computer Chemistry Center* en Alemania que publicó dos libros relacionados a esta disciplina (Chen W., 2006).

Sin embargo, en esos años ni el término “quimiometría” ni el término “química informática” tuvieron el mayor éxito como nuevas disciplinas, en cambio, el término “bioinformática”, que se refiere al estudio de los procesos informáticos en sistemas biológicos, comenzaba a ganar terreno debido a las grandes aportaciones que surgieron en esta época, entre estas aportaciones está el proyecto del genoma humano, resultando así en una gran relevancia de esta nueva disciplina en la investigación (NIH, 1990-2003).

Con la aceptación del término “bioinformática” se llegó a aplicar la parte química en la bioinformática, generándose el término “quimioinformática”. En general, se le reconoce al doctor Frank Brown haber introducido por primera vez este término en los informes anuales de química medicinal en 1998 (Brown F., 1998). Posteriormente, en 2003 se publicó el Manual de quimioinformática elaborado por el profesor Johann Gasteiger (Gasteiger J., 2003). Estos aportes son el punto de partida para incluir a la quimioinformática en la investigación realizada en los años siguientes. Debido a esto, la quimioinformática se ha convertido en el estándar para las aplicaciones informáticas en la química (Chen W., 2006).

En 1998 el doctor Frank Brown mencionó que: “El uso de la tecnología y la gestión de la información se han convertido en una parte fundamental del proceso de descubrimiento de fármacos. La quimioinformática es la combinación de esos recursos de información para transformar los datos en información y la información en conocimiento con el fin previsto de tomar mejores decisiones más rápidamente en el área de identificación y organización de líderes de medicamentos” dando así uno de los primeros conceptos de quimioinformática (Brown F., 1998). Por otro lado,

el profesor Gasteiger en sus cuatro volúmenes del Manual de quimioinformática define este término como: “La quimioinformática es el uso de métodos informáticos para resolver problemas químicos” (Gasteiger J., 2003). Estas definiciones nos dan un acercamiento a lo que trata esta disciplina, es decir, al uso de tecnologías de la información para su aplicación en sistemas químicos.

La quimioinformática tomó gran relevancia después de estos acontecimientos, con el paso de los años se ha incrementado su utilización en la investigación, en especial en el descubrimiento de nuevos fármacos. Esta disciplina permite realizar predicciones del comportamiento de un fármaco en el organismo, es decir, permite predecir su comportamiento farmacocinético y farmacodinámico. Gracias al uso de estas herramientas se han logrado diseñar nuevos fármacos con mayor potencia farmacológica y con menor cantidad de efectos adversos; también se han desarrollado profármacos que mejoran las propiedades fisicoquímicas de la molécula y por lo tanto su biodisponibilidad (Medina J., 2015).

3. Marco Teórico

3.1. Quimioterapia

A lo largo del tiempo se han buscado terapias para aplicar a personas que presentan cáncer y así disminuir la mortalidad provocada por esta enfermedad. Se han buscado alternativas como radioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia, cirugía y quimioterapia. Desde hace mucho tiempo se empezó a realizar investigación para encontrar la terapia adecuada; sin embargo, una de las terapias más longevas y utilizadas es la quimioterapia. El Instituto Nacional del Cáncer lo define como un tratamiento del cáncer que utiliza fármacos para destruir células cancerosas (NCI, 2015).

El proceso de división celular es fundamental para la efectividad de la quimioterapia. Esto debido a que los agentes quimioterapéuticos pueden atacar a las células cancerosas en este proceso, en consecuencia, dichos agentes pueden clasificarse dependiendo de la fase del ciclo celular en donde sean activos. Algunos ejemplos

de estos agentes son los dependientes de fase "S", como la prednisona, capecitabina, entre otros; agentes dependientes de fase "M", como los alcaloides de la vinca y los taxanos; agentes dependientes de la fase "G₂", como la bleomicina, irinotecán, entre otros; y, por último, los agentes dependientes de la fase "G₁", como la asparaginasa y los corticoesteroides. Existen otro tipo de agentes quimioterapéuticos como los agentes alquilantes o antimetabolitos que no son específicos al ciclo celular, por lo que su clasificación es diferente (Page R., 2011).

Existen diversas razones por las cuales la quimioterapia no es efectiva en pacientes con cáncer, entre estas se encuentran una variedad de mecanismos anatómicos, farmacológicos y bioquímicos. Uno de estos problemas es la ubicación del tumor, es decir, las complicaciones comienzan cuando se encuentran barreras anatómicas para llegar al sitio, además de ser terapias inespecíficas, lo que también provoca un daño a células no cancerosas y, a su vez, la aparición de efectos adversos en el paciente. Otra dificultad que presenta esta terapia es la sobreexpresión del gen *MRD₁* en células cancerosas, este gen codifica para una glicoproteína, Glicoproteína P (P-gp), la cual sirve para eliminar toxinas o metabolitos endógenos de la célula, por lo tanto, una concentración alta de esta proteína está correlacionada con la resistencia a agentes citotóxicos. Sin embargo, existen alternativas como una coadministración de un agente citotóxico y un inhibidor de la P-gp, evitando así, la eliminación del agente citotóxico (Page R., 2011).

3.2. Microtúbulos como blancos terapéuticos

El término tubulina se refiere a una familia de proteínas globulares con un tamaño de 55 KDa, esta a su vez está formada por las tubulinas "α", "β", y "γ". Comúnmente, se le llama tubulina al dímero formado por las dos proteínas globulares, la α-tubulina y la β-tubulina (Imagen 1), estas proteínas tienen una homología de cerca del 40% (Nogales, 2000).

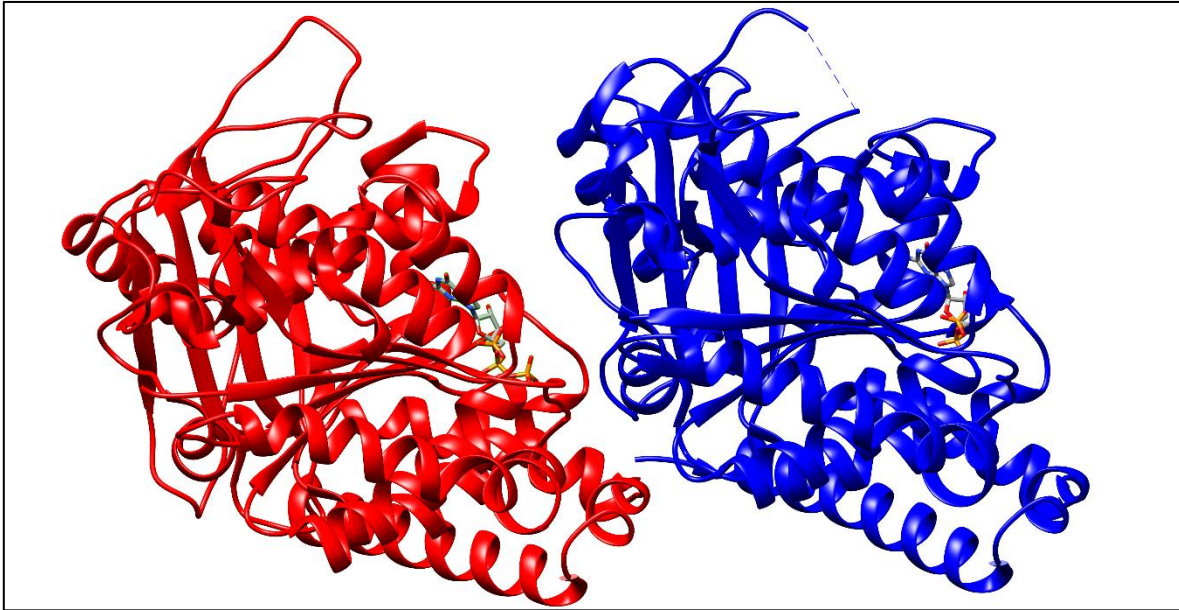


Imagen 1. Estructura del dímero α/β -tubulina, la subunidad α se muestra de color rojo, esta subunidad tiene ligada una molécula de GTP (izquierda), la subunidad β se muestra de color azul y tiene ligada una molécula de GDP (derecha). Archivo 5LYJ de Protein Data Bank (PDB).

Los microtúbulos son polímeros de α/β -tubulina, estos son fundamentales para las funciones del citoesqueleto como la división celular de las células eucariotas. La polimerización de estos microtúbulos se lleva a cabo mediante un mecanismo de nucleación y elongación, en donde el primer paso del proceso es la nucleación, este paso se da de manera lenta, posteriormente se da una rápida elongación del microtúbulo debido a la adición reversible y no covalente de los dímeros de tubulina en los extremos (Brouhard G., 2018). Los dímeros se adicionan cabeza a cola, una vez formados los protofilamentos rectos, es decir, las cadenas de dímeros de tubulina, son asociados de manera paralela estableciendo una interacción lateral entre ellos para dar paso a la formación de la pared cilíndrica de los microtúbulos (Steinmetz M., 2018).

Los protofilamentos tienen una polaridad estructural, es decir, la α -tubulina siempre estará presente en un extremo del protofilamento, extremo negativo, y la β -tubulina estará presente en el otro extremo, extremo positivo, que es en donde se añadirán las nuevas subunidades para la elongación del microtúbulo, es decir, en este extremo positivo predomina la polimerización, a diferencia de la despolimerización

que predomina en el extremo negativo. En resumen, los microfilamentos suelen crecer por el extremo positivo y, si no está protegido, decrecer por el extremo negativo. En la célula, los microtúbulos se encuentran unidos por el extremo negativo al centrosoma, y tienen una elongación a partir de un anillo de γ -tubulina, y el extremo positivo se dirigen hacia la periferia y se encuentran libres en el citoplasma (Trigili C., 2013).

La tubulina, además de estar presente en los microtúbulos, también se encuentra en el citosol de manera no polimerizada, lo que facilita el intercambio de dímeros entre el citosol y los microtúbulos para la reordenación celular de los polímeros en caso de ser necesario. Una vez iniciado el proceso de elongación de los microtúbulos, la adición de nuevos dímeros permite que el microtúbulo crezca en longitud, sin embargo, hay ocasiones en que este crecimiento se detiene repentinamente y comienza a despolimerizarse, en ocasiones desencadenando la desaparición de este microtúbulo o, en su defecto, provocando el reinicio de la polimerización, a este proceso alternado se le denomina inestabilidad dinámica (Brouhard G., 2018).

En el citoplasma, los dímeros libres tienen presente el cofactor GTP, cuando hay una adición de un nuevo dímero a un microtúbulo en crecimiento se produce una hidrólisis del GTP, como consecuencia, este cofactor se convierte en GDP. Si la velocidad con la que se adicionan nuevos dímeros de tubulina es mayor a la velocidad en la que se hidroliza el GTP, en el extremo positivo de la elongación se encontrará un GTP unido, a esta unión de dímeros positivos con GTP se le conoce como “tapón de GTP”, provocando que el extremo positivo sea más estable, y a su vez, que el microtúbulo crezca en longitud (Imagen 2) (Steinmetz M., 2018).

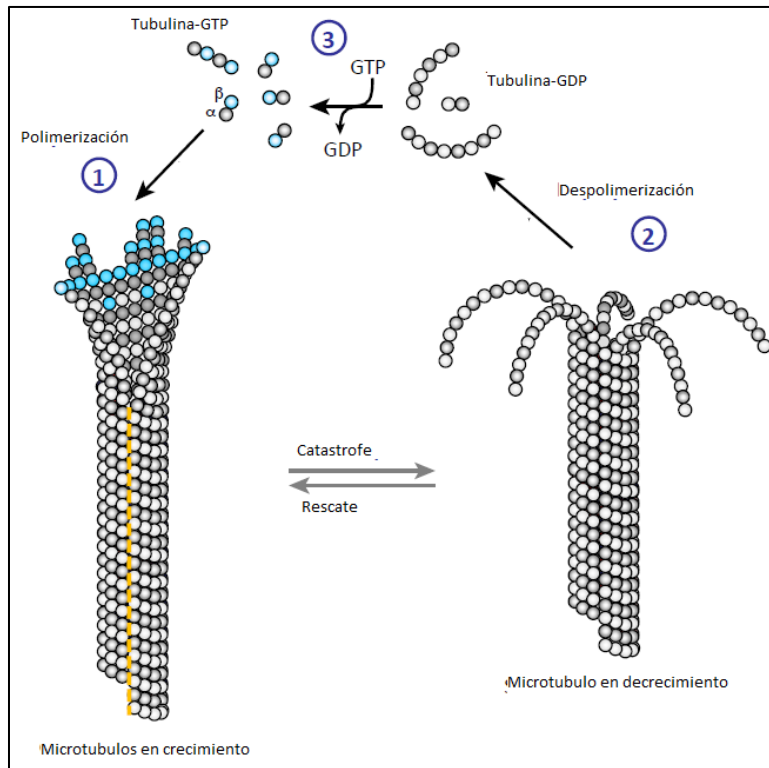


Imagen 2. Dinámica de los microtúbulos. (1) Agregación de los dímeros de tubulina para la elongación del microtúbulo, (2) Tras la pérdida del complejo tubulina-GTP, comienza una despolimerización del microtúbulo, (3) Intercambio de GTP a GDP continuando el ensamblaje del microtúbulo. (Modificado de Brouhard G., 2018).

En los seres humanos existen ocho subtipos de α -tubulina, mientras que existen diez subtipos de β -tubulina (UniProt, 2020). Estos subtipos son agrupados de acuerdo con las modificaciones postraduccionales que tienen presentes en su estructura proteica (Mollinedo F., 2003).

Debido a que los microtúbulos están implicados en procesos vitales para las células, los compuestos que se han identificado que interfieren con las funciones del citoesqueleto se han desarrollado como agentes citotóxicos para combatir parásitos y el cáncer (Trigili C., 2013).

Por otra parte, en la naturaleza existen diversos compuestos de interés (productos naturales), el uso de estos compuestos es diverso; uno de los principales usos de estos se encuentra en el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos. El

surgimiento del descubrimiento y desarrollo de fármacos dirigidos a microtúbulos comenzó precisamente con productos naturales; los alcaloides de la vinca y la colchicina fueron las primeras moléculas aisladas para su estudio como agentes antimitóticos (Trigili C., 2013).

Los fármacos dirigidos a microtúbulos perturban la dinámica de estos durante la mitosis, y muchas veces, promueven la apoptosis, siendo esta estrategia la utilizada en quimioterapia contra el cáncer. En altas concentraciones, los fármacos pueden interactuar con los microtúbulos de dos formas: pueden ser agentes estabilizadores de microtúbulos o pueden ser agentes desestabilizadores de estos. En el caso de los primeros, logran su efecto promoviendo el ensamblaje de los microtúbulos, mientras que, los segundos promueven el desensamblaje. En cambio, a bajas concentraciones y clínicamente relevantes, ambos tipos de agentes suprimen principalmente la dinámica de los microtúbulos sin afectar significativamente la masa del polímero de tubulina (Dumontet C., 2010).

Hasta el año 2013 se habían identificado y caracterizado estructuralmente tres sitios de unión de ligandos a tubulina: el sitio del taxano, de la colchicina y de la vinca; sin embargo, con el pasar de los años se han investigado otros sitios de unión adicionales mediante cristalografía de rayos X y microscopía crioelectrónica; estos sitios adicionales son: el sitio de maitansina, el sitio de laulimalida/pelorusida y sitio de pironetina (Steinmetz M., 2018).

Dentro de los agentes estabilizadores de microtúbulos tenemos a los ligandos del sitio de taxano y ligandos del sitio de laulimalida/pelorusida (Islam M., 2004).

En el caso del sitio de taxano, el paclitaxel fue el primer agente descrito, con el paso de los años y el avance en tecnología, otros agentes como la epotilona fueron identificados; estos ligandos del sitio de taxano comparten el modo de unión a tubulina, se unen a un bucle en la β -tubulina del lado luminal de los microtúbulos (Imagen 3). El sitio de taxano está formado principalmente por residuos hidrofóbicos de la hélice H7, la hebra S7 y los bucles H6-H7, S7-H9 y S9-S10 de β -tubulina (Steinmetz M., 2018). Todos los ligandos del sitio de taxano establecen contactos

tanto hidrófobos como polares con varios de estos elementos estructurales secundarios. Por tanto, el sitio de taxano podría considerarse como un conjunto de subsitios funcionalmente diverso cuya ocupación diferencial por un ligando provoca diferentes efectos conformacionales en la tubulina dentro de la red de microtúbulos. Estos efectos diferentes conformacionales son:

- 1) La estabilización de los microtúbulos fortaleciendo los contactos longitudinales de la tubulina a través de un mecanismo alostérico y
- 2) La inhibición de la hidrólisis o reducción de la afinidad del nucleótido GTP ubicado de forma remota en la β -tubulina,

Todo esto provocado por otro mecanismo alostérico (Dumontet C., 2010).

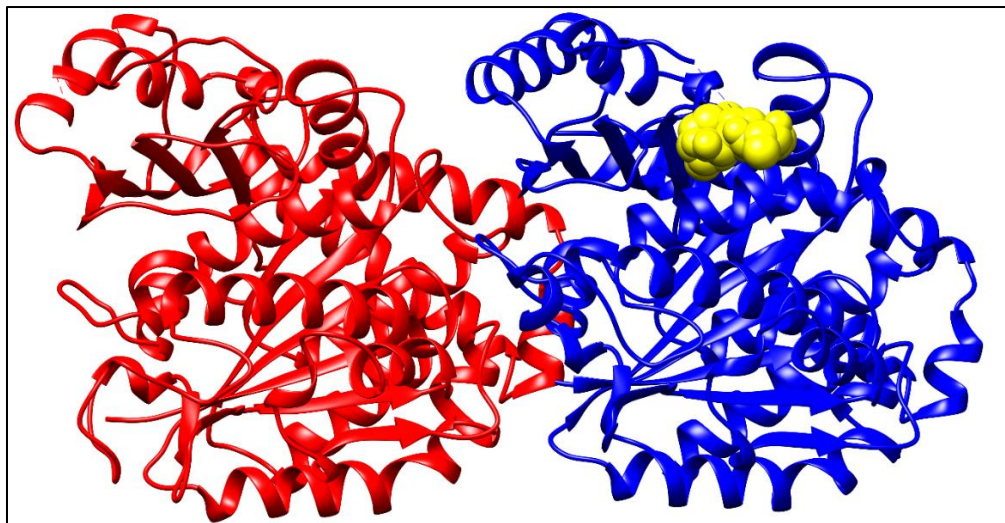


Imagen 3. Estructura del dímero α/β -tubulina, la subunidad α se muestra de color rojo, la subunidad β se muestra de color azul y tiene ligada una molécula de ciclostreptina (amarillo), la cual está ligada al sitio del taxol. Archivo 6QTN de Protein Data Bank (PDB).

Por otro lado, también dentro de los agentes estabilizadores encontramos a los ligandos del sitio de laulimalida/pelorusida, estos exhiben una actividad citotóxica significativa contra una gran variedad de líneas celulares cancerosas (Kanakkantara A., 2015). A diferencia del sitio del taxano que se encuentra en el lado luminal del microtúbulo, el sitio de la laulimalida/pelorusida se encuentra en el bucle común de la β -tubulina mirando hacia el exterior del microtúbulo (Imagen 4).

El sitio laulimalida/pelorusida está formado por residuos hidrófobos y polares de las hélices H9 y H10, y los bucles H9-H90 y H10-S9 de β -tubulina. Se coloca cerca de la interfaz lateral entre los protofilamentos en la superficie exterior del microtúbulo. En principio, ambos ligandos podrían establecer contactos laterales con la hélice H3 de la subunidad de tubulina yuxtapuesta en el protofilamento adyacente y, por lo tanto, pueden inhibir el desmontaje de microtúbulos actuando como "abrazaderas" moleculares que mantienen unidos los protofilamentos (Steinmetz M., 2018).

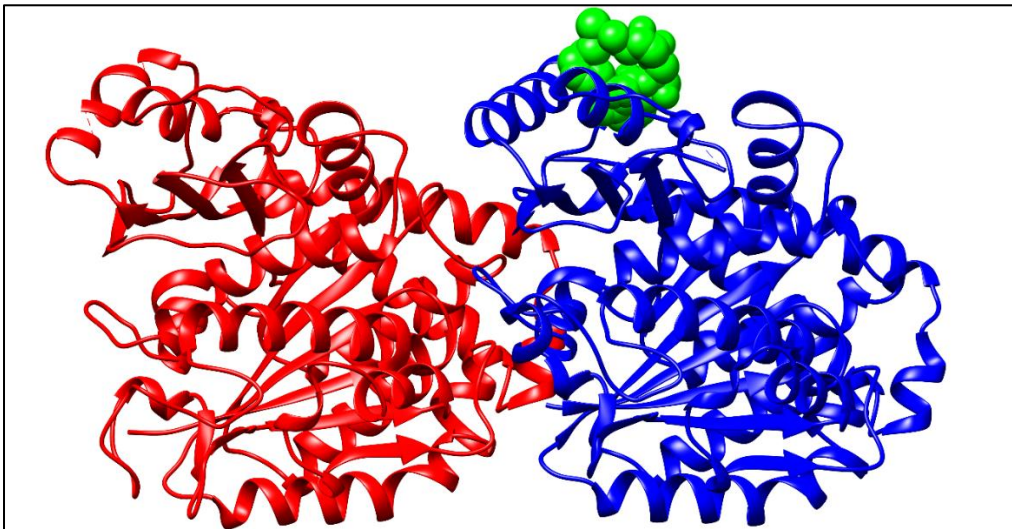


Imagen 4. Estructura del dímero α/β -tubulina, la subunidad α se muestra de color rojo, la subunidad β se muestra de color azul y tiene ligada una molécula de laulimalida (verde), la cual está ligada al sitio de laulimalida/pelorusida. Archivo 4O4I de Protein Data Bank (PDB).

En el dímero de α/β -tubulina también existen sitios en donde los ligandos que se unen funcionan como agentes desestabilizadores de microtúbulos, estos ligandos se unen en los sitios de: colchicina, alcaloides de la vinca, maitansina y pironetina.

El sitio de la colchicina es uno de los más estudiados, además, se han desarrollado análogos de la colchicina para su evaluación citotóxica, incluso se han identificado otros ligandos como las combretastatinas que provocan un mayor efecto citotóxico (Gaspari R., 2017). Este sitio es un bucle profundo encontrado en el dominio intermedio de la β -tubulina, encontrándose en la interfaz intradimérica entre las subunidades α y β (Imagen 5). Está conformado por las hélices H7 y H8, el bucle

T7 y las hebras S8 y S9 de β -tubulina, y se completa con el bucle T5 de α -tubulina. El sitio se puede subdividir en una zona principal en el centro del dominio (zona 2) y dos bolsillos accesorios adicionales que miran hacia la subunidad de α -tubulina (zona 1) o están enterrados más profundamente en la subunidad de β -tubulina (Ravelli R., 2004). Los ligandos del sitio de colchicina que se han caracterizado estructuralmente hasta ahora se agrupan en las zonas 1 y 2, o en las zonas 2 y 3, pero no se ha descrito ningún ligando que ocupe las tres zonas simultáneamente (Steinmetz M., 2018).

Los ligandos unidos a este sitio de la colchicina interactúan principalmente por contactos hidrofóbicos y algunos contactos polares. En el curso normal de la formación de microtúbulos, los dímeros de tubulina experimentan cambios conformacionales desde una estructura curva en su estado libre, hasta una estructura recta formada en los microtúbulos, es justo en este proceso en donde los agentes desestabilizadores de unión al sitio de colchicina participan, la transición conformacional de curva a recta se caracteriza por el movimiento del dominio intermedio de las subunidades α y β de la tubulina, en el que las hebras S8 y S9, entre otras, se acercan a la hélice H8 (Steinmetz M., 2018). Estos cambios conformacionales van acompañados de una traducción de la hélice H7 y conducen a una contracción general del sitio de la colchicina. Por lo tanto, la unión de un ligando al sitio de la colchicina inhibe la formación de microtúbulos principalmente al prevenir el cambio conformacional de curvado a recto en la tubulina (Ravelli R., 2004).

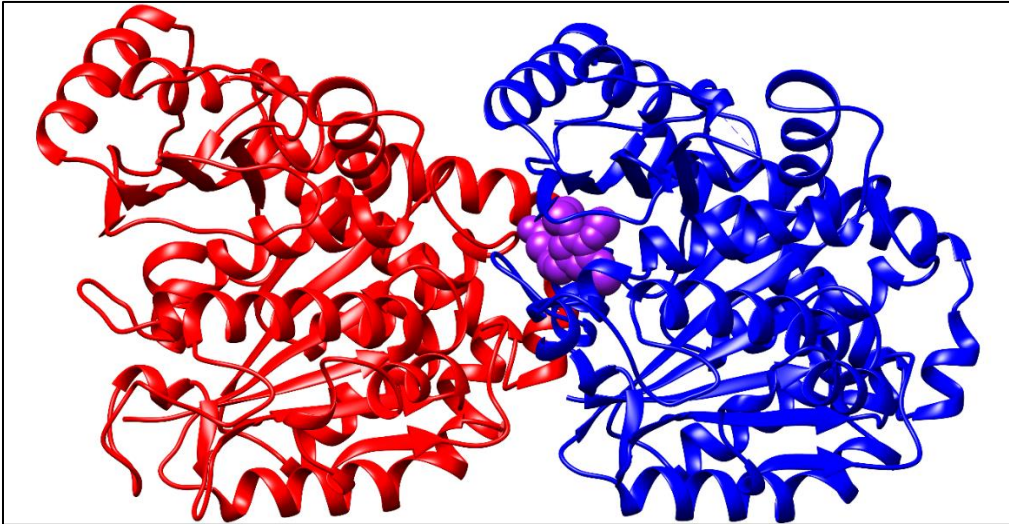


Imagen 5. Estructura del dímero α/β -tubulina, la subunidad α se muestra de color rojo, la subunidad β se muestra de color azul y tiene ligada una molécula de combretastatina A4 (morado), la cual está ligada al sitio de colchicina. Archivo 5LYJ de Protein Data Bank (PDB).

De la misma forma, dentro de estos agentes desestabilizadores se pueden encontrar los ligandos que se unen al sitio de los alcaloides de la vinca, estos ligandos forman parte de la familia más antigua de compuestos que se dirigen a dicho sitio de unión en la tubulina. Los compuestos más estudiados de esta familia son la vinblastina y la vincristina, los cuales han recibido una evaluación clínica extensa demostrando su efectividad contra una gran variedad de neoplasias malignas (Johnson E., 1963).

Los ligandos que se dirigen al sitio de los alcaloides de la vinca se unen en la interfaz entre dímeros de tubulina alineados longitudinalmente (Imagen 6). El sitio de la vinca consta de una zona central, que se ha definido en función de las interacciones establecidas por los alcaloides de la vinca, y un bolsillo que se extiende hacia el sitio del nucleótido de guanosina intercambiable en la β -tubulina (Dumontet C., 2010). Los elementos estructurales secundarios de la zona del núcleo comprenden el giro C-terminal de la hélice H6, los bucles T5 y H6– H7 de β 1-tubulina, y la hélice H10, la hebra S9 y el bucle T7 de α 2-tubulina. Los ligandos que se alargan más allá del núcleo del sitio vinca forman interacciones más extensas con el bucle β 1-tubulina

H6-H7 y la hélice H7, y con el nucleótido unido a β -tubulina, inhibiendo así su intercambio (Steinmetz M., 2018).

La desestabilización de los microtúbulos por los ligandos del sitio de los alcaloides de la vinca se logra mediante la introducción de una "cuña" molecular en la punta de los microtúbulos, esta evita la transición curva a recta de la tubulina necesaria para la incorporación adecuada en los microtúbulos, o secuestrando los dímeros de tubulina en oligómeros en forma de anillo que son incompatibles con la estructura del protofilamento recto en los microtúbulos. La unión del ligando inhibe aún más el posicionamiento adecuado de los residuos catalíticos de α -tubulina que promueven la hidrólisis de GTP en β -tubulina (Trigili C., 2013).

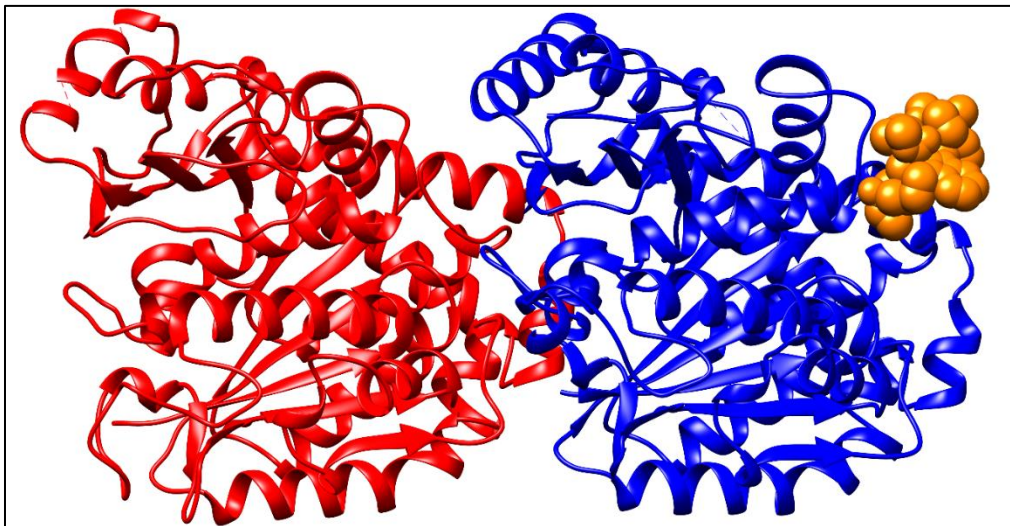


Imagen 6. Estructura del dímero α/β -tubulina, la subunidad α se muestra de color rojo, la subunidad β se muestra de color azul y tiene ligada una molécula de vinblastina (naranja), la cual está ligada al sitio de los alcaloides de la vinca. Archivo 4EB6 de Protein Data Bank (PDB).

Otros agentes desestabilizadores son los ligandos que se unen al sitio de la maitansina. Este sitio es distinto al de la vinca y está ubicado en un bolsillo expuesto de β -tubulina, que aloja el bucle H10-S9, la hebra S8 y la hélice H8 de α -tubulina en la interfaz longitudinal de la tubulina en los microtúbulos (Imagen 7). Se encuentra adyacente al nucleótido de guanosina y está formado por residuos hidrófobos y polares de las hélices H30, H11 y H110, así como por los bucles S3-H30 (bucle T3), S5-H5 (bucle T5) y H11-H110 de β -tubulina (Prota A., 2014). Los ligandos del sitio

de la maitansina bloquean directamente la formación de contactos longitudinales de tubulina en los microtúbulos, ya sea inhibiendo la adición de más dímeros de tubulina a los extremos positivos de los microtúbulos en crecimiento o formando complejos de ligando-tubulina incompetentes para el ensamblaje a concentraciones altas de ligando (Steinmetz M., 2018).

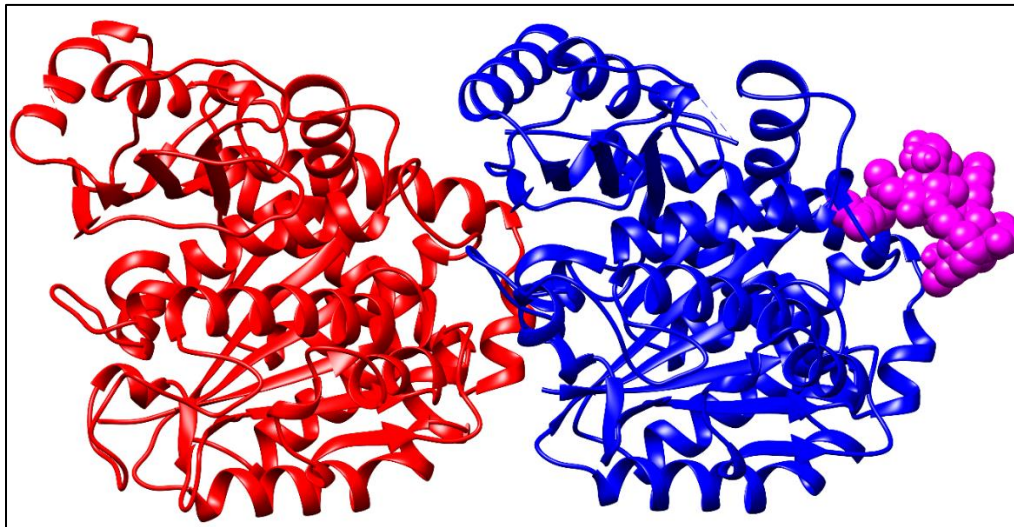


Imagen 7. Estructura del dímero α/β -tubulina, la subunidad α se muestra de color rojo, la subunidad β se muestra de color azul y tiene ligada una molécula de espongistatina (rosa), la cual está ligada al sitio de la maitansina. Archivo 6FII de Protein Data Bank (PDB).

Y, por último, tenemos a los ligandos desestabilizadores que se unen al sitio de la pironetina, se ha propuesto que la pironetina desestabiliza los microtúbulos al perturbar la formación de los contactos laterales de la tubulina en los microtúbulos (Bañuelos A., 2014). Sin embargo, dos estudios recientes de cristalografía de rayos X independientes informaron de la unión covalente de pironetina a Cys316 de α -tubulina (Yang J., 2016). El ligando se une a un bolsillo hidrofóbico extendido en α -tubulina, con su anillo de pirona interactúa con los residuos de las cadenas S8 y S10, y con la hélice H7 (Imagen 8). La cadena lateral de pironetina está unida en un bolsillo formado por residuos que pertenecen a la hélice H7 y por las hebras S4, S5 y S6. Este modo de unión provoca un trastorno del bucle T7 y una perturbación conformacional en la sección *N*-terminal de la hélice H8 de una tubulina. Debido a que estos dos elementos estructurales secundarios establecen contactos

longitudinales clave de tubulina a lo largo de los protofilamentos en los microtúbulos, se propuso que su perturbación puede prevenir la formación de microtúbulos, ya sea a altas concentraciones de ligando formando complejos de tubulina-pironetina incompetentes para el ensamblaje, o en concentraciones de compuestos subestequiométricos inhibiendo adición de más dímeros de tubulina en los extremos negativos de los microtúbulos que exponen las subunidades de α -tubulina (Prota A., 2016). En particular, la pironetina es el único compuesto conocido hasta la fecha que se dirige exclusivamente a la subunidad α -tubulina.

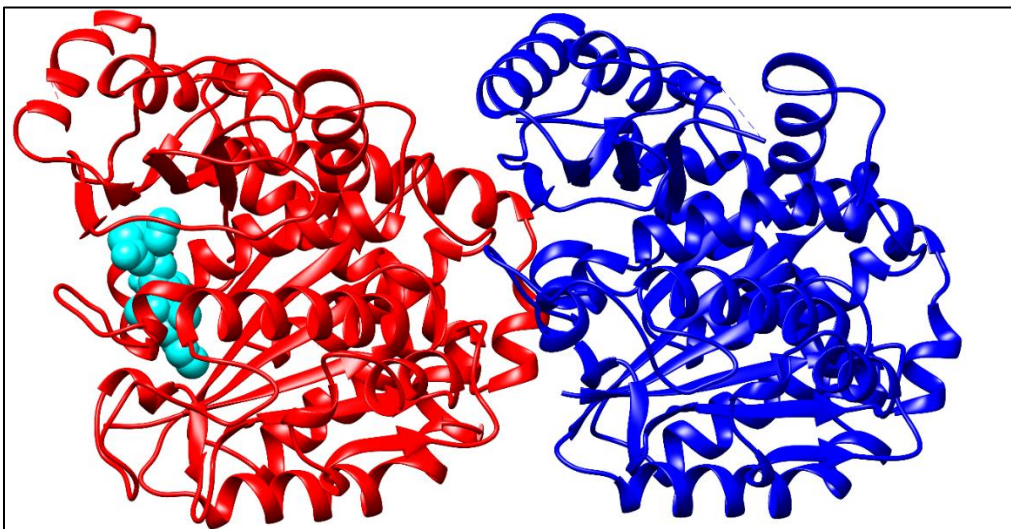


Imagen 8. Estructura del dímero α/β -tubulina, la subunidad α se muestra de color rojo, la subunidad β se muestra de color azul y tiene ligada una molécula de pironetina (cian), la cual está ligada al sitio del mismo nombre. Archivo 5LA6 de Protein Data Bank (PDB).

Estos agentes, tanto estabilizadores como desestabilizadores, interactúan con la tubulina modificando la dinámica de la formación de microtúbulos, por lo que son sitios potenciales para combatir enfermedades como el cáncer; en la Imagen 9 se observan los diferentes sitios activos en los dímeros α/β -tubulina descritos anteriormente.

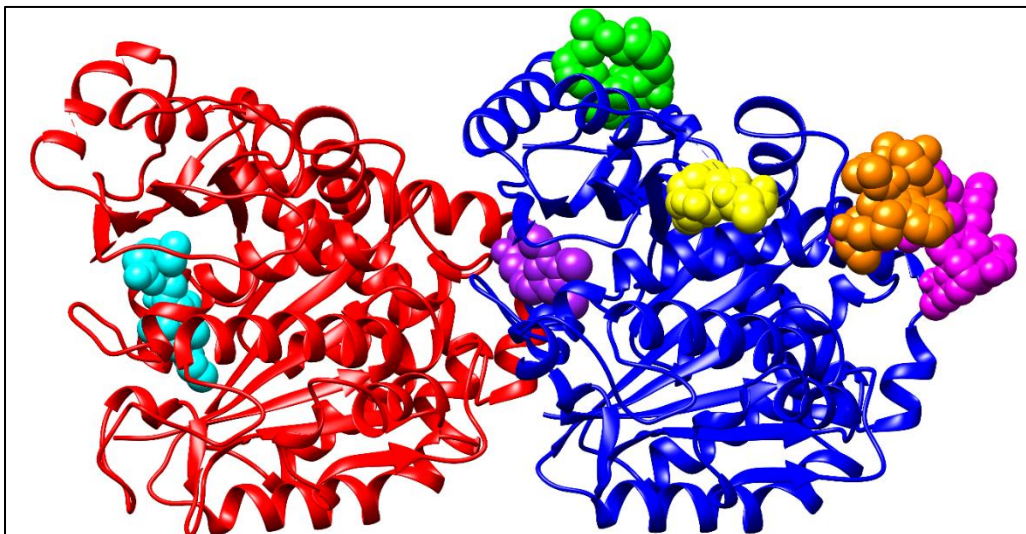


Imagen 9. Estructura del dímero α/β -tubulina y sus diferentes sitios activos. La subunidad α se muestra de color rojo y tiene una molécula ligada al sitio de pironetina (cian), la subunidad β se muestra de color azul y tiene una molécula ligada al sitio de la colchicina (morado), una molécula ligada al sitio de los taxanos (amarillo), una molécula ligada al sitio de laulimalida/pelorusida (verde), una molécula ligada al sitio de los alcaloides de la vinca (naranja) y una molécula ligada al sitio de la maitansina (rosa). Archivos obtenidos de Protein Data Bank (PDB).

3.3. Combretastatina A-4

La combretastatina A-4 tiene un peso molecular de 316.353 g/mol, su fórmula molecular es $C_{18}H_{20}O_5$, tiene una estructura 2D mostrada en la Imagen 10a y una estructura 3D mostrada en la Imagen 10b, su nombre IUPAC es 2-metoxi-5-[(Z)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)etenil]fenol (NCBI, 2018).

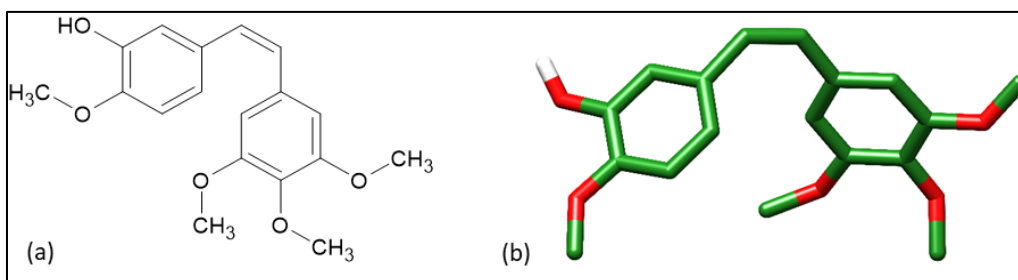


Imagen 10. Estructura en 2D y 3D de la combretastatina A-4

Este fármaco está indicado para el tratamiento anaplásico de tiroides, su clasificación farmacológica MeSH se encuentra en agentes neoplásicos,

fitogénicos, agente obtenido de plantas superiores que tienen actividad citostática o antineoplásica demostrable, y está clasificada como fármaco humano y las tubulinas son su objetivo (NCBI, 2018).

Según datos de NCBI existen alrededor de 3972 registros de patentes relacionados con esta molécula. También esta base de datos menciona que se han realizado 4539 bioanálisis, de los cuales, en 2457 resultó activo para la actividad citotóxica *in vitro* contra la línea celular de cáncer de ovario humano (SK-OV3) (Sharma V., 2003), 112 inconclusos como la inhibición de la transcriptasa inversa del VIH-1 (Cullen M., 2008), 33 inactivos como la apoptosis en células ECV304 humanas fuertemente adherentes a 10 nM evaluadas como fragmentación de ADN (Gujar M., 2007), y 1937 sin especificar.

Los compuestos activos extraídos de *Combretum caffrum* se reportaron por primera vez hace poco más de tres décadas y originalmente se describió a la combretastatina A-4 como un fuerte inhibidor de la tubulina y del crecimiento celular; sin embargo, debido a su escasa solubilidad en agua se ha desarrollado un profármaco más soluble para su estudio *in vivo* y en humanos, el fosfato de combretastatina A-4. A pesar de su bajo peso molecular y su estructura molecular simple, la combretastatina A-4 es uno de los inhibidores más potentes de la polimerización de tubulina conocidos hasta la fecha. Una estructura que aporta solo dos anillos aromáticos unidos por un doble enlace en la configuración *cis* puede llevar a un número limitado de análogos que se parecerán a su compuesto original, mientras que las posibles modificaciones estructurales que puede experimentar son infinitas (Tron G., 2006).

El análisis *in vitro* del ciclo celular de las células tratadas con la combretastatina A-4 o sus análogos cercanos sugiere que las células se detienen después de unas pocas horas en la fase G2 / M en concentraciones cercanas a los valores de CI_{50} para la citotoxicidad. Tales efectos sugerirían fuertemente que la tubulina es un objetivo relevante para las combretastatinas (Tron G., 2006).

Sin embargo, se esperaría que un agente específico del ciclo celular produzca fuertes efectos secundarios hematopoyéticos, que en su lugar están ausentes en los pacientes tratados con combretastatina A-4. Otro dilema está representado por la fuerte selectividad de este agente *in vivo* para la neovasculatura y la citotoxicidad no selectiva contrastante *in vitro* (prácticamente todas las líneas celulares analizadas son igualmente sensibles al fármaco). Una posibilidad es que la exposición prolongada de las células al fármaco produce una toxicidad no selectiva, mientras que la selectividad en las células endoteliales es evidente después de exposiciones cortas (Tron G., 2006).

3.4. Ciclooxigenasas

Los metabolitos del ácido araquidónico (AA) son fundamentales para diversos procesos biológicos, como la inflamación, ovulación, implantación, angiogénesis, agregación plaquetaria y función inmunológica. Los eicosanoides son productos del metabolismo AA, y las enzimas ciclooxigenasas desempeñan un papel clave en su producción. El AA es un ácido graso insaturado de veinte carbonos distribuido por la bicapa lipídica de la célula, y habitualmente se esterifica en la posición SN-2 de los fosfolípidos. Las enzimas fosfolipasas transforman el araquidonato unido a la membrana, lo que lo hace disponible para su conversión en lípidos bioactivos; ya liberado, el AA se puede metabolizar a través de una de las tres vías principales: la vía de la ciclooxigenasa; la vía de la lipoxigenasa; o la vía de la monooxigenasa del citocromo P-450. Además, la peroxidación de radicales libres puede convertir el ácido araquidónico de forma no enzimática para producir isoprostanos (Williams C., 2006).

La ciclooxigenasa-1 (COX-1) cataliza la conversión del AA en prostaglandina H₂, esta molécula es el sustrato inmediato de un amplio número de prostaglandinas y tromboxano sintasas específicas (Williams C., 2006). Esto ocurre en dos pasos, en el primer paso se introducen dos moléculas de oxígeno al araquidonato, formando el intermedio de peróxido bicíclico, prostaglandina G₂. El segundo paso ocurre en un sitio reactivo distinto ubicado en el otro lado de la molécula y requiere la difusión de prostaglandina G₂ a este sitio. Aquí, la peroxidación da como resultado la

reducción de prostaglandina G2 a prostaglandina H2 libremente difusible. Aunque estas enzimas están unidas a la membrana, no contienen dominios transmembranales; más bien, poseen cuatro hélices anfipáticas yuxtapuestas de modo que forman una región localizada de hidrofobicidad. La región hidrófoba sirve para anclar la porción inferior de la enzima en la membrana. El sitio activo de la ciclooxigenasa se encuentra en un área de hidrofobicidad cerca de las hélices anfipáticas. El acceso a este sitio se produce a través de un canal enterrado en la bicapa lipídica. Tanto el sustrato como los inhibidores utilizan este canal para llegar al sitio activo (Rouzer C., 2009).

Hasta el momento se conocen 3 tipos de COX, sin embargo, las COX 1 y 2 son las que toman más importancia y son las más estudiadas (Sobolewski C., 2010). La COX-1 y la COX-2 humanas son homodímeros de 576 y 581 aminoácidos, respectivamente. Ambas enzimas contienen tres oligosacáridos ricos en manosa, uno de los cuales facilita el plegamiento de proteínas. Un cuarto oligosacárido, presente solo en COX-2, regula su degradación. Estas dos enzimas tienen el 60% de identidad en secuencia, por lo que sus estructuras tridimensionales son casi superponibles. Cada subunidad del dímero consta de tres dominios, el dominio del factor de crecimiento epidérmico (residuos 34 a 72), el dominio de unión a la membrana (residuos 73 a 116) y el dominio catalítico que comprende la mayor parte de la proteína, este dominio contiene los sitios activos de la ciclooxigenasa y la peroxidasa en ambos lados del grupo protésico hemo (Mbonye U., 2008; Smith W., 2000).

El sitio activo de la ciclooxigenasa se encuentra en el lado opuesto del hemo del sitio activo de la peroxidasa, en la parte superior de un canal en forma de L que se origina en el dominio de unión a la membrana. La boca del canal consiste en el vestíbulo, un gran volumen que se estrecha hasta un límite que debe abrirse antes de que los sustratos o inhibidores puedan penetrar más profundamente en el canal. Por encima del límite, el canal está rodeado por residuos hidrófobos, que delimitan la curva en ángulo casi recto y el extremo estrecho. Cuando el AA se une al sitio activo de la ciclooxigenasa, se encuentra con su grupo carboxilo en la constricción

y su grupo v-metilo en el extremo estrecho del canal. Esto coloca al carbono 13 de AA en la curva del canal muy cerca de Tyr-385, que es el aminoácido catalítico crítico para la reacción de la ciclooxigenasa (Smith W., 2000).

La diferencia en el patrón de expresión génica proporciona una explicación de la existencia de las dos isoformas de COX, lo que sugiere que la COX-1 proporciona prostaglandinas que se requieren para las funciones homeostáticas, incluida la citoprotección gástrica y la hemostasia, mientras que la COX-2 desempeña el papel predominante en formación de prostaglandinas durante estados fisiopatológicos, como inflamación y tumorigénesis (Rouzer C., 2009).

3.5. Aldo ceto reductasa 1C familia 3

Las enzimas aldo ceto reductasa 1C (AKR1C) comprenden una subfamilia de la superfamilia de aldo ceto reductasa (AKR). La subfamilia de AKR1C humana consta de cuatro isoformas (AKR1C1-AKR1C4), son enzimas metabólicas de fase I que dependen del fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) para desempeñar sus funciones cruciales en la reducción de 3-ceto, 17-ceto y 20-cetoesteroides (Lanisnik T., 2019).

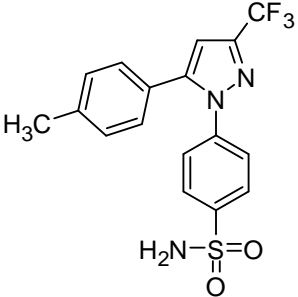
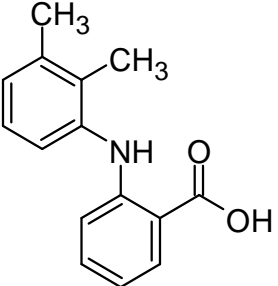
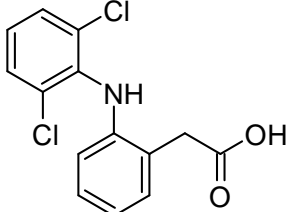
Estas enzimas pueden utilizar una amplia variedad de sustratos, incluidos esteroides endógenos, prostaglandinas y compuestos exógenos. Las enzimas AKR1C participan en reacciones de oxidorreducción. Sin embargo, al exhibir una mayor afinidad por NADPH, AKR1C3 realiza principalmente su actividad reductora *in vivo* (Liu Y., 2020).

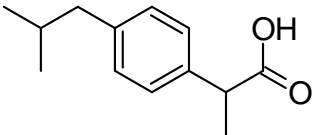
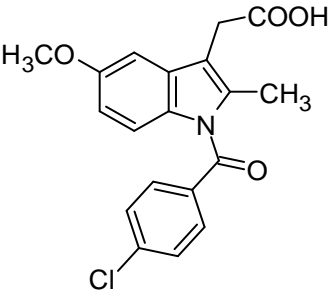
3.6. Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) forman parte de los medicamentos más prescritos del mundo, son utilizados principalmente para el tratamiento de la inflamación, dolor, edema, osteoartritis, artritis reumatoide y trastornos musculoesqueléticos; estos ejercen su función inhibiendo a las enzimas COX, pueden ser selectivos a COX-2 o no selectivos para las diferentes isoformas de las COX (Thun M., 2007). En la Tabla 1 se muestra de manera general las principales

características de los AINEs empleados como cabeza de serie en el diseño molecular del presente estudio. Es importante resaltar que dentro de los inhibidores selectivos COX-2, se encuentra el celecoxib, mientras los AINEs restantes son no selectivos.

Tabla 1. Principales características de AINEs empleados como cabeza de serie en el diseño molecular del presente estudio.

Fármaco	Estructura	Uso como antiinflamatorio	Datos contra cáncer
Celecoxib		<p>*Tratamiento sintomático de la osteoartritis y la artritis reumatoide</p> <p>*Selectivo para COX-2</p> <p>*Se usa para tratar el dolor agudo, espondilitis anquilosante y dismenorrea primaria</p>	<p>*Ejerce efectos anticancerígenos al unirse a cadherina-11 (DrugBank, 2021)</p> <p>* Al inhibir la COX-2 puede resultar en apoptosis y reducción de la angiogénesis y metástasis tumorales (DrugBank, 2021)</p>
Ácido mefenámico		<p>* Se utiliza para aliviar el dolor leve a moderado, incluidos los dolores de cabeza, el dolor dental, la osteoartritis y la artritis reumatoide</p> <p>*Inhibidor no selectivo de COX</p>	N/A
Diclofenaco		<p>*Analgésico no narcótico, antipirético, inhibidor COX, y fármaco antiinflamatorio no esteroideo</p> <p>*Inhibidor no selectivo de COX</p>	N/A

<p>Ibuprofeno</p>		<p>*Fármaco antiinflamatorio no esteroideo, analgésico no narcótico, inhibidor de ciclooxigenasa 2, inhibidor de ciclooxigenasa 1, antipirético, eliminador de radicales</p> <p>*Inhibidor no selectivo de COX</p>	<p>*Estudio demuestra que el uso de ibuprofeno para el cáncer de mama muestra una disminución del 50% en la tasa de cáncer de mama (Harris R., 1999)</p>
<p>Indometacina</p>		<p>*Se utiliza para aliviar el dolor reducir la fiebre, la hinchazón, el enrojecimiento y la sensibilidad de la artritis gotosa aguda</p> <p>*Inhibidor no selectivo de COX</p>	<p>N/A</p>

3.7. Descubrimiento y diseño de fármacos asistido por computadora

El proceso de desarrollo de un fármaco es complejo, se comienza con la identificación de moléculas que se unen a un blanco terapéutico y muestran una actividad biológica, estas moléculas reciben el nombre de “hits”, después de realizar este proceso de tamizaje, se comienza la búsqueda de compuestos que presenten propiedades farmacéuticas adecuadas, como baja toxicidad, una adecuada solubilidad acuosa, entre otras. Una vez encontradas las moléculas que presentan actividad biológica y con buenas propiedades farmacéuticas, toman el nombre de “líderes” o “cabezas de serie”; comúnmente los líderes son desarrollados a partir de los hits, este desarrollo de líderes se da por la modificación química de estos compuestos para mejorar sus propiedades (Saldivar F., 2017).

En la Imagen 11 se puede observar, de manera resumida, el proceso del desarrollo de fármacos, este proceso comienza con la identificación del problema, es decir, con la investigación acerca de una enfermedad de interés. En ocasiones esta

búsqueda puede arrojar blancos terapéuticos involucrados en dicha enfermedad, posteriormente se realiza una búsqueda de moléculas que interactúen con el blanco para generar una actividad biológica, es decir, se realizan estudios *in vitro*; después, ya identificada la molécula que presentó actividad biológica, se hacen modificaciones a la molécula para mejorar sus propiedades farmacéuticas, esto se conoce como optimización de los candidatos. Estos compuestos activos se someten a diversos estudios, primero se comienza con ensayos en líneas celulares, posteriormente se hacen ensayos en animales, y para finalizar, se hacen pruebas clínicas en humanos; una vez pasadas todas las pruebas, el compuesto debe ser sometido a una evaluación por la entidad regulatoria de cada país, en el caso de México, la entidad regulatoria es la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios COFEPRIS (Saldivar F., 2017).

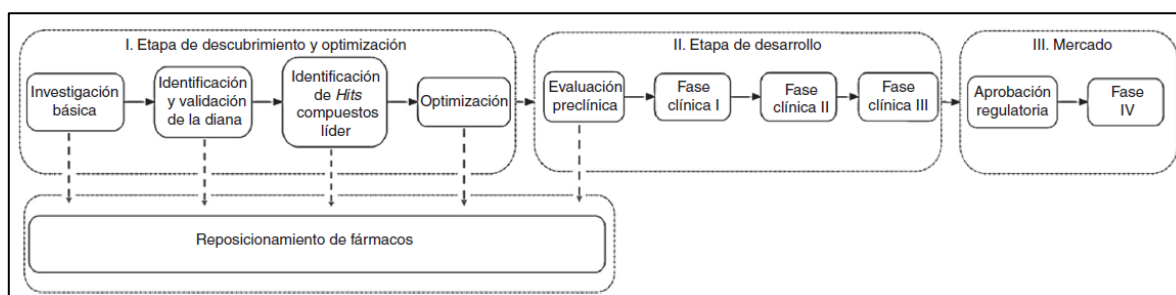


Imagen 11. Etapas clásicas en el desarrollo de un fármaco. Imagen tomada de (Saldivar F., 2017)

La mayoría de los compuestos que presentan actividad *“in vitro”* fallan en las siguientes pruebas, mucho de esto se debe a sus malas propiedades farmacológicas o su alta toxicidad. Se estima que el desarrollo de un fármaco puede llevarse aproximadamente de diez a quince años, además de tener una inversión de ochocientos millones de dólares, este alto costo se asocia principalmente a la gran cantidad de moléculas que no aprueban una o varias etapas del proceso del desarrollo (Saldivar F., 2017). Debido a esta situación, se han generado estrategias para identificar compuestos líderes, una de estas estrategias es el diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).

En 2006, Medina Franco menciona que el DIFAC tiene como principio entender las relaciones estructura-actividad biológica o farmacológica de compuestos. El DIFAC tiene tres objetivos principales: descubrir moléculas activas, optimizar moléculas activas ya conocidas y seleccionar, de un grupo dado de estructuras, a los candidatos que tengan mayor o menor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos (Medina J., 2006).

El DIFAC es un proceso multidisciplinario, en este proceso se abordan diferentes áreas de investigación, desde la química teórica, la quimioinformática, la bioinformática, el modelado molecular, entre otras. El proceso del diseño de fármacos asistido por computadora, muchas veces da falsas expectativas, una expectativa falsa pero común es que las computadoras pueden diseñar fármacos por sí solas, esto es falso debido a que toda la información que se obtiene en los análisis "*in silico*" debe ser procesada por personal capacitado, esto para poder interpretar los resultados y tomar las mejores decisiones para realizar la evaluación *in vitro* e *in vivo*, las tres evaluaciones son complementarias (Medina J., 2015).

El DIFAC se divide en dos estrategias principales: el diseño basado en la estructura del ligando y diseño basado en la estructura del receptor, estas estrategias se derivan de la teoría de la llave-cerradura entre la molécula y el blanco, aunque en la actualidad se buscan de igual manera estrategias de polifarmacología, la cual puede propiciar que una sola molécula interactúe con diversos blancos terapéuticos y así optimizar la actividad biológica deseada (Saldivar F., 2017).

El diseño basado en la estructura del ligando se centra en el estudio de la estructura química de la molécula que presenta actividad biológica, pudiendo diseñar nuevas moléculas; mientras que el diseño basado en la estructura del receptor se centra en la estructura tridimensional de la macromolécula diana con la que interactúa el ligando. Dependiendo de la información que se tenga, es la estrategia que se utilizará, incluso, teniendo información tanto del ligando como del receptor, es conveniente hacer el uso de las dos estrategias (Medina J., 2006).

El diseño basado en la estructura del receptor es de gran relevancia y utilidad ya que experimentalmente se puede conocer la estructura tridimensional de muchas de estas macromoléculas. Una fuente común de obtención de estructuras tridimensionales de biomoléculas es el Protein Data Bank (RCSB). Esta base de datos pública contiene la estructura tridimensional de miles de proteínas obtenidas por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (Medina J., 2006).

Uno de los métodos de diseño basado en la estructura del receptor es el llamado diseño *de Novo* que consiste en construir moléculas directamente en el receptor (Schneide G., 2005). Otro método, que hoy en día es más empleado, es el acoplamiento molecular automatizado (Kitchen D., 2004).

El diseño basado en la estructura del ligando depende en gran medida de la información experimental disponible para estructuras químicas que presentan actividad biológica conocida, un método muy común en este ámbito son los estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) (Medina J., 2006).

3.8. Acoplamiento molecular (*molecular docking*)

El acoplamiento molecular se puede utilizar para modelar la interacción entre una molécula pequeña y una proteína a nivel atómico, esto permite caracterizar el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio de unión de las proteínas diana, así como dilucidar procesos bioquímicos fundamentales. El proceso de acoplamiento implica dos pasos básicos: la predicción de la conformación del ligando, así como su posición y orientación dentro de estos sitios y, la evaluación de la afinidad de unión (Meng X., 2011).

Para comprender el funcionamiento del proceso de acoplamiento molecular es necesario conocer las propiedades moleculares que intervienen en dicho proceso; la geometría y la estructura general de una molécula se describen por sus distancias de enlace, ángulos diedros y ángulo de enlace, este conjunto de ángulos y distancias forman coordenadas que definen la posición de cada átomo en una estructura molecular tridimensional (Vlachakis D., 2018). Por otro lado, la condición

energética de la molécula también se puede evaluar, la energía de una molécula incluye todas las formas de energía, es decir, incluye el movimiento cinético, que involucra la vibración, rotación y traslación, y la energía potencial de la molécula. La energía potencial de una molécula se puede definir mediante el análisis de la interacción electrostática entre cargas, las interacciones magnéticas entre cargas giratorias y la energía potencial de los enlaces de la molécula. La energía total es indicativa de la reactividad y estabilidad de esa molécula o sistema (Novikov F., 2009).

Mediante el modelado molecular es posible cuantificar las características anteriores del sistema y, por ejemplo, predecir su reactividad. Hay dos campos en el modelado molecular que intentan hacer esto: la mecánica molecular y la mecánica cuántica (Vlachakis D., 2018).

El acoplamiento molecular generalmente implica abordar dos tareas interrelacionadas: el muestreo de posibles estados conformacionales del complejo proteína-ligando y el cálculo de la energía libre de dichos complejos o producir una puntuación que se correlacione con la actividad biológica u otra función. Matemáticamente, el algoritmo de muestreo devuelve conformaciones proteína-ligando que se posicionan en el espacio de búsqueda del mínimo global de energía de unión proteína-ligando, mientras que la función de puntuación evalúa con precisión cada conformación diferente utilizando ciertos campos de fuerza y reglas de la física, es así como la función de puntuación genera un valor que describe la energía del sistema en la conformación dada. Las energías bajas indican interacciones mejores y más estables (Novikov F., 2009).

Al pasar de los años se han implementado enfoques matemáticos en programas de acoplamiento molecular, entre ellos están los algoritmos de Monte Carlo utilizados por los programas ICM y GlamDock; algoritmos genéticos utilizados por los programas AutoDock, Fitted, Gold, MolDock; construcción incremental de una postura óptima del ligando utilizados por los programas DOCK, FlexX y Surflex; análisis sistemático de posibles mínimos utilizando búsquedas gráficas, implementado en el programa eHits; algoritmos que utilizan funciones de puntuación

jerárquica para un ajuste de forma cruda y una optimización más fina de la postura del ligando, utilizado en los programas QXP, LiganFit y Glide (Novikov F., 2009).

Tanto el algoritmo de Monte Carlo como el algoritmo genético son métodos estocásticos, estos algoritmos buscan el espacio conformacional modificando aleatoriamente una conformación de ligando o una población de ligandos (Meng X., 2011).

La implementación de los algoritmos genéticos se deriva de la teoría de la evolución de Darwin. Los grados de libertad del ligando se codifican como cadenas binarias llamadas genes. Estos genes forman el "cromosoma" que en realidad representa la conformación del ligando. La mutación y el cruce son dos tipos de operadores genéticos en este tipo de algoritmo, la mutación produce cambios aleatorios en los genes; el cruce intercambia genes entre dos cromosomas. Cuando los operadores genéticos afectan los genes, el resultado es una nueva estructura de ligando. Las nuevas estructuras se evaluarán mediante la función de puntuación (Meng X., 2011).

Por otro lado, el propósito de la función de puntuación es diferenciar las posturas correctas de las posturas incorrectas o los ligandos de compuestos inactivos en un tiempo de cálculo razonable. Sin embargo, las funciones de puntuación implican estimar, en lugar de calcular, la afinidad de unión entre la proteína y el ligando y, a través de estas funciones adoptar varias suposiciones y simplificaciones. Las funciones de puntuación se pueden dividir en aquellas basadas en campos de fuerza, empíricas y basadas en el conocimiento (Kitchen D., 2004).

Las funciones de puntuación que utilizan campos de fuerza evalúan la energía de unión calculando la suma de las interacciones no enlazadas, es decir las fuerzas electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals. Las extensiones de las funciones de puntuación basadas en campos de fuerza consideran los enlaces de hidrógeno, las solvataciones y las contribuciones de entropía. Los programas DOCK, GOLD y AutoDock utilizan este tipo de función de puntuación (Novikov F., 2009).

3.9. Quimioinformática

Una herramienta muy importante para el diseño de fármacos asistido por computadora es la quimioinformática, esta herramienta utiliza una combinación de recursos informáticos y datos químicos, se utiliza para manejar, visualizar y analizar sistemáticamente la información química. La quimioinformática permite analizar miles de datos en tiempos relativamente cortos, por lo que puede hacer más eficiente el proceso del descubrimiento y desarrollo de fármacos (Saldivar F., 2017).

El análisis de datos químicos en computadora requiere de métodos específicos para su lectura en un ordenador; de manera normal, una molécula puede tener varias representaciones, puede caracterizarse por su nombre, por su estructura bidimensional o su estructura tridimensional, todo esto debe de extrapolarse a métodos computacionales (Engel T., 2006).

Existen notaciones lineales para la representación de moléculas que utilizan una secuencia lineal de caracteres y números; las notaciones lineales más utilizadas son WLN (Wiswesser Line Notation), ROSDAL (Representation of Organic Structures Description Arranged Linearly), SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) y SLN (SYBYL Line Notation), siendo la notación SMILES la más utilizada en la actualidad debido a que esta notación es más fácil de manipular y comprender en comparación con las otras notaciones (Leach A., 2007).

En comparación con otras notaciones, SMILES se basa en algunas reglas fundamentales para convertir una estructura en una cadena de caracteres. SMILES fue creado en 1986 por David Weininger para el procesamiento de datos químicos y ha encontrado una amplia distribución como nomenclatura química universal para la representación e intercambio de estructuras químicas (Engel T., 2006).

Además de las notaciones lineales, uno de los métodos internacionales para la representación de estructuras químicas es el método gráfico, es decir, el diagrama de estructura; desde un punto de vista matemático, un diagrama de estructura puede considerarse como un gráfico topológico construido con nodos o vértices (átomos) conectados por aristas o arcos (enlaces). Un diagrama de estructura en

3D, que incluye solo la constitución en 2D de la molécula, plantea un problema de flexibilidad conformacional y el efecto de la rotación de moléculas alrededor de enlaces simples. La flexibilidad conformacional es un efecto importante que permite, por ejemplo, que un fármaco ajuste su forma a los requisitos estructurales de una proteína receptora (Engel T., 2006).

El problema con los modelos gráficos 3D ha tratado de solucionarse con el desarrollo de algoritmos y sistemas de bases de datos, muchos de estos algoritmos utilizan la mecánica cuántica y la simulación molecular para poder afrontar las dificultades que representan las estructuras 3D rígidas. Además del desarrollo de algoritmos, se han creado bases de datos respaldadas por datos experimentales o métodos computacionales. Las metodologías experimentales más conocidas son las que involucran estructuras determinadas por métodos de cristalografía de rayos X. Existen bases de datos que contienen miles de estructuras resueltas por este método, las bases de datos más conocidas son Cambridge Structural Database (CSD), que contiene las estructuras de rayos X de más de cuatrocientos mil compuestos orgánicos y organometálicos; y Protein Data Bank (PDB) que a la fecha contiene más de ciento setenta y seis mil estructuras de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) de proteínas y complejos proteína-ligando y algunas estructuras de ácidos nucleicos y carbohidratos (Leach A., 2007).

El PDB se ha utilizado ampliamente para mejorar la comprensión de la naturaleza de la estructura de las proteínas y su relación con la secuencia de aminoácidos, también ha proporcionado información sobre la naturaleza de las interacciones entre los aminoácidos y proteínas con las moléculas de agua y los ligandos de moléculas pequeñas (Leach A., 2007).

3.10. Descriptores moleculares y predicción de propiedades fisicoquímicas

Una aplicación directa de la quimioinformática es la predicción de datos físicos, químicos o biológicos, esto se correlaciona directamente con la información de la estructura química (Engel T., 2006). Esta información se puede analizar y manipular gracias al uso de descriptores moleculares. Se han descrito y utilizado una gran

cantidad de descriptores moleculares distintos para diferentes propósitos, por ejemplo, existen descriptores moleculares que representan propiedades de moléculas completas como el log P y la refractividad molar; descriptores que se calculan a partir de representaciones 2D como los índices topológicos y las huellas digitales en 2D; y descriptores con representaciones en 3D como los rasgos farmacóforicos (Pharmacophore Keys) de una molécula (Leach A., 2007).

La utilización de los descriptores moleculares para la predicción de propiedades ha sido un gran avance en el área del descubrimiento y desarrollo de fármacos, ya que se pueden predecir propiedades de la molécula en estudio, por lo que con esta predicción se pueden hacer análisis de datos para determinar si la molécula en estudio es buen candidato, para así extrapolar los estudios *in silico* a estudios *in vitro* e *in vivo*. Algunas de las propiedades que presentan mayor importancia son las propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad), entre estas propiedades se encuentran el coeficiente de partición octanol/agua, el cual puede relacionarse directamente con el log P o con la lipofilia de la molécula, la solubilidad acuosa, la biodisponibilidad evaluada con la regla de los 5 de Lipinski, pK_a , toxicidad y mutagénesis. Además, se pueden predecir algunas propiedades de cálculo más complejo como el paso de la BHE y la unión a proteínas plasmáticas (Roca C., 2018).

3.10.1. SwissADME

Uno de los programas en línea más utilizado para la predicción de propiedades fisicoquímicas y farmacológicas es SwissADME. Este servidor en línea hace uso de diversas técnicas para realizar la predicción, entre estas técnicas está la utilización de un descriptor molecular llamado huella dactilar (fingerprint), esta huella dactilar consiste en una secuencia de bits que define la presencia o ausencia de características químicas en una molécula, por lo que se compara con una biblioteca de pequeñas moléculas proporcionando las predicciones de las propiedades. Las ventajas de SwissADME son: diferentes métodos de entrada, cálculo para múltiples moléculas y la posibilidad de mostrar, guardar y compartir resultados por molécula individual o mediante gráficos globales intuitivos e interactivos (Daina A., 2017).

3.10.2. OSIRIS

OSIRIS es un programa que permite hacer predicción de propiedades ADMET, esto lo hace con representaciones de estructuras químicas, las propiedades que pueden ser calculadas son la lipofilidad ($c\text{Log}P$), mutagenicidad, efectos a nivel reproductivo, tumorigénicos e irritantes, los resultados obtenidos son representados por color: verde (valores aceptables) y rojo (efectos no deseados). Este programa también permite la predicción de la semejanza de la estructura química con respecto a fármacos existentes, además, arroja una puntuación derivada de los parámetros evaluados para predecir si la molécula insertada puede considerarse como candidato a fármaco (POC, 2021).

3.10.3. PASS Online

Otro uso de las herramientas quimiinformáticas es la predicción del espectro de actividad biológica para sustancias. La plataforma en línea PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) ha tomado gran relevancia con el paso del tiempo, esta herramienta, por medio de métodos de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), permite evaluar el potencial biológico de una molécula con respecto a su estructura química. Esta plataforma cuenta con una amplia base de datos con más de 300,000 compuestos registrados. La plataforma realiza un análisis dentro de la base de datos arrojando la probabilidad de actividad (P_a) y la probabilidad de inactividad (P_i). Los valores obtenidos de P_a reflejan la similitud del compuesto a evaluar con respecto a las moléculas presentes en la base de datos, siendo indicadores de una buena probabilidad de actividad cuando se obtienen valores de P_a mayores a 0.7, una mediana probabilidad con valores entre 0.5 y 0.7, y una baja probabilidad con valores menores a 0.5 (Filimonov D., 2014).

3.10.4. SwissTargetPrediction

Otra de las plataformas en línea para la predicción de dianas terapéuticas es SwissTargetPrediction, esta plataforma utiliza la combinación de descriptores moleculares de similitud en 2D y 3D, por lo que permite calcular la probabilidad de la actividad de una molécula pequeña comparándola con una biblioteca de

alrededor de doscientos ochenta mil compuestos activos en más de dos mil objetivos de cinco organismos diferentes; esta plataforma es de fácil manejo ya que permite insertar los códigos SMILES en su buscador o dibujar directamente la molécula en 2D utilizando un constructor de moléculas. Los resultados obtenidos se enlistan en posibles dianas terapéuticas con la que la molécula insertada puede interactuar de acuerdo con la similitud que encuentre con la base de datos; las dianas terapéuticas se clasifican de acuerdo con la probabilidad de que la molécula insertada presente actividad en ellas. Además, muestra una gráfica circular que representa el tipo de diana terapéutica (factores de transcripción, proteínas, enzimas o sin clasificación, entre otras) con la que el ligando tiene probabilidad de interactuar (Daina A., 2019).

4. Planteamiento del problema

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y el número de casos aumenta cada año en cifras alarmantes. Aunque existen algunos agentes quimioterapéuticos en contra de esta enfermedad, aún hay muchas limitantes para su tratamiento. Los temas de resistencia, reincidencia y toxicidad de los fármacos son muy comunes; la OMS indica que un alto porcentaje de tratamientos quimioterapéuticos para cáncer presentan problemas de toxicidad ya que no son selectivos; de igual manera, esta organización presenta el tema de reincidencia, indicando que el riesgo de esta es mayor cuando se administra tanto la quimioterapia como la terapia de radiación. Es por esta razón que existe la necesidad de realizar una búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad citotóxica; siguiendo una estrategia de diseño y evaluación *in silico*, para aumentar la probabilidad de obtener compuestos potencialmente activos en una evaluación *in vitro* e *in vivo* para que puedan llegar a desarrollarse a largo plazo como agentes anticancerígenos.

5. Hipótesis

A partir de la evaluación *in silico* de derivados híbridos de antiinflamatorios con combretastatina A4 se obtendrán candidatos con potencial actividad biológica para contribuir en la búsqueda de nuevas moléculas anticancerígenas.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Realizar la evaluación *in silico* de derivados híbridos de antiinflamatorios con combretastatina A4 para proponer nuevas moléculas con potencial actividad anticancerígena.

6.2. Objetivos específicos

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre blancos terapéuticos de los antiinflamatorios celecoxib, ácido mefenámico, diclofenaco, ibuprofeno e indometacina y el producto natural combretastatina A4 involucrados en el cáncer.
2. Proponer mediante métodos computacionales blancos terapéuticos adicionales relacionados al cáncer para los derivados híbridos **1–15** utilizando las plataformas en línea Swiss Target Prediction y PASS online.
3. Calcular mediante métodos computacionales las propiedades fisicoquímicas, los parámetros farmacocinéticos y la viabilidad estructural de los compuestos **1–15**, para ser estudiados como compuestos cabeza de serie conforme a los criterios químico-farmacéuticos tradicionales utilizando la plataforma en línea SwissADME y el programa OSIRIS DataWarrior.
4. Realizar el acoplamiento molecular de los compuestos diseñados **1–15**, sobre los blancos terapéuticos identificados y relacionados con el tratamiento del cáncer utilizando los programas AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD.
5. Realizar el acoplamiento molecular dirigido, utilizando el programa AutoDock Vina, sobre los diferentes sitios de unión conocidos de fármacos a α/β tubulina

(taxanos, laulimalida, pironetina, maitansina y vinca) con los derivados híbridos 1–15.

6. Proponer una estrategia de síntesis viable para la preparación de los derivados híbridos con mejores resultados en los estudios de acoplamiento molecular.

7. Materiales y métodos

7.1. Identificación de blancos terapéuticos de AINEs y combretastatina A4, relacionados con el cáncer

Se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos como PubMed, Scopus, Web of Science y PubChem utilizando palabras clave como “cancer”, “antiinflammatory”, “combretastatin A4”, además de los operadores booleanos “and” y “or” para obtener información necesaria para realizar la identificación de los blancos terapéuticos. Se utilizó como criterio de inclusión la elección de documentos que determinaban la relación entre el blanco terapéutico y algún tipo de cáncer. Como criterio de exclusión se descartó aquella información que tenía más de 15 años de haber sido publicada.

7.2. Predicción de blancos terapéuticos de derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4, relacionados con el cáncer

Se construyeron las estructuras de los derivados híbridos en 2D con el programa ChemSketch 2019.2.0 para la obtención de los SMILES de las moléculas, estos SMILES fueron introducidos a las bases de datos en línea SwissTargetPrediction y PASS online para obtener la predicción de los blancos moleculares en los cuales los derivados híbridos tienen una mayor probabilidad de unión. Obtenidos los blancos moleculares, se hizo una revisión bibliográfica en bases de datos como PubMed para obtener solo los blancos moleculares involucrados en cáncer.

7.3. Predicción de propiedades de los derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4

Se elaboraron las estructuras de los derivados híbridos en 2D con el programa ChemSketch 2019.2.0 para la obtención de los SMILES de las moléculas, estos

SMILES fueron introducidos a las bases de datos en línea SwissADME y al programa OSIRIS para obtener la predicción de las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de los compuestos.

7.4. Acoplamiento molecular

El estudio de acoplamiento molecular se realizó utilizando los programas AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD.

Los ligandos fueron construidos con el programa ChemSketch 2019.2.0 y obtenidos en estructura 3D, posteriormente los ligandos fueron minimizados para su optimización utilizando el campo de fuerza universal (UFF, Universal Force Field), los ligandos fueron obtenidos en formato .mol2 para ser utilizados en el programa GOLD; para los programas AutoDock Vina y AutoDock 4.2 estos archivos fueron exportados al programa AutoDock Tools 1.5.6 para generar el formato .pdbqt de cada molécula.

Las estructuras cristalográficas de los blancos moleculares identificados fueron obtenidas de la base de datos de Protein Data Bank con los números de acceso 5LYJ (complejo tubulina-combretastatina A4), 3R8G (complejo AKR1C3 con ibuprofeno), 3KK6 (complejo ciclooxigenasa 1 con celecoxib) y 5KIR (complejo ciclooxigenasa 2 con ácido mefenámico). Las estructuras proteicas fueron preparadas con el programa Chimera 1.14, eliminando residuos de agua, otras moléculas presentes en el complejo y el ligando unido; se añadieron cargas a los aminoácidos correspondientes y por último se realizó la minimización de la estructura con el campo de fuerza AMBER ff14sb, los archivos de los blancos moleculares optimizados fueron obtenidos en formato .pdb para ser utilizados en el programa GOLD; para los programas AutoDock Vina y AutoDock 4.2, estos archivos fueron exportados al programa AutoDock Tools 1.5.6 para generar el formato .pdbqt de cada blanco molecular.

La validación del método se llevó a cabo utilizando los ligandos cristalizados y ligandos creados a partir del cristalizado, una vez obtenidos los ligandos fueron

evaluados en un cálculo de acoplamiento molecular, posteriormente se realizó una comparación entre las mejores conformaciones obtenidas del ligando creado y del ligando cristalizado, esta comparación utilizó el RMSD (*Root-Mean-Square Deviation of atomic position*) como indicador, este indicador fue obtenido con el programa AutoDock Tools 1.5.7.

Posteriormente se determinaron las condiciones óptimas del cálculo de acoplamiento molecular con el fin de obtener información relevante sobre las interacciones fármaco-receptor. Los ligandos y los blancos moleculares preparados fueron introducidos a los programas AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD en el caso de los blancos identificados. Para el caso del acoplamiento molecular dirigido a los diferentes sitios de unión en α/β -tubulina se utilizó el programa AutoDock Vina solamente.

Por último, los archivos de salida del acoplamiento molecular fueron analizados con el programa PyMOL, las mejores conformaciones fueron exportadas en formato .pdb para la generación de los diagramas de interacción en 2D con el programa Discovery Studio 2020 y los diagramas de interacción en 3D con el programa Chimera 1.14.

7.5. Estudios preliminares de síntesis química

Para determinar la ruta de síntesis de tres series de derivados híbridos (ácido mefenámico, diclofenaco e ibuprofeno, y la combretastatina A4) se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos SciFinder para identificar las reacciones reportadas que incluyen un acoplamiento C-N. Una vez obtenida la información, se realizaron los estudios de síntesis correspondientes, se exploraron diversas metodologías hasta determinar una ruta de síntesis eficiente en relación con el costo, seguridad y rendimiento de la reacción.

8. Resultados y discusión

8.1. Identificación de blancos terapéuticos de AINEs y combretastatina A4, relacionados con el cáncer

La búsqueda bibliográfica arrojó los blancos moleculares mostrados en la Tabla 2. El celecoxib se ha asociado con diversos blancos terapéuticos involucrados en el cáncer; sin embargo, el blanco principal asociado es la ciclooxigenasa 2. Existe evidencia de que las prostaglandinas generadas por COX-2 participan en la angiogénesis, un proceso común tanto para el funcionamiento de los tejidos como para el cáncer. La expansión máxima del tumor ocurre cuando este es capaz de escapar de la vigilancia inmunológica, evitando así el ataque antitumoral de macrófagos activados y células T citotóxicas. Se ha demostrado que las prostaglandinas generadas por COX-2 son inmunosupresoras. En modelos tumorales, la PGE2 secretada por macrófagos suprime tanto la citotoxicidad mediada por macrófagos como la mediada por células *natural killer* (Williams C., 2006).

De igual manera se ha identificado que el ácido mefenámico, diclofenaco, ibuprofeno e indometacina inhiben a las COX 1 y 2, y en el caso del celecoxib que es inhibidor selectivo COX 2. Diversos estudios experimentales, epidemiológicos y clínicos indican la participación de las COX 1 y 2 en el proceso inflamatorio agudo y la angiogénesis del tumor; ya que estos AINEs son inhibidores de estas enzimas, se pueden relacionar con un efecto quimiopreventivo para ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de colon (Thun M., 2007).

Por otro lado, también se identificó que el ácido mefenámico, ibuprofeno e indometacina son activos para la enzima AKR1C3, el papel de esta enzima en los cánceres dependientes de hormonas y prostaglandinas se ha investigado en varios sistemas, incluidos el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de endometrio y la leucemia mielógena aguda. AKR1C3 se sobre expresa en una variedad de cánceres, más notablemente cáncer de próstata y mama, con una correlación entre los niveles de expresión y la agresividad de la enfermedad. El

metabolismo de las prostaglandinas y las hormonas dependientes de AKR1C3 es, por tanto, un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos con aplicación tanto a los cánceres dependientes de hormonas como a los independientes (Flanagan J., 2012).

La combretastatina A-4 es uno de los inhibidores más potentes de la polimerización de tubulina, es un agente citotóxico conocido, debido a que la polimerización de la tubulina es un proceso fundamental para la división celular, la inhibición de esta polimerización se ha identificado como un tratamiento potencial para diversos tipos de cáncer, es por ello que a través del tiempo se ha identificado a la tubulina como un blanco potencial para tratar este tipo de padecimientos (Dumontet C., 2010).

Tabla 2. Blancos moleculares encontrados a partir de la revisión bibliográfica

Fármaco	Blanco identificado
Celecoxib	Ciclooxigenasa 2 selectivo
Ácido mefenámico	Ciclooxigenasa 1 y 2
	Aldo-ceto reductasa 1C3 (AKR1C3)
Diclofenaco	Ciclooxigenasa 1 y 2
Ibuprofeno	Ciclooxigenasa 1 y 2
	Aldo-ceto reductasa 1C3 (AKR1C3)
Indometacina	Ciclooxigenasa 1 y 2
	Aldo-ceto reductasa 1C3 (AKR1C3)
Combretastatina A-4	Tubulina

8.2. Predicción de blancos terapéuticos de derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4, involucrados en cáncer

En la Tabla 3 se presentan los blancos terapéuticos obtenidos en las plataformas en línea Swiss Target Prediction y PassOnline. Los blancos identificados se especifican con la probabilidad de actividad que presentan las moléculas **1–15** sobre estos.

Tabla 3. Blancos moleculares obtenidos en Swiss Target Prediction y PassOnline

Fármaco de plantilla de diseño	Molécula híbrida con C-A4	Blancos Swiss Target Prediction (probabilidad)	Blancos PassOnline (Pa)	Blancos en común
Celecoxib	1	COX-1(0.87) y COX-2 (1)	COX-1(0.92) y COX-2 (0.90)	COX 1 y 2
	2	COX-1 (0.22) y COX-2 (0.69)	COX-1(0.91) y COX-2 (0.89)	COX 1 y 2
	3	COX-1 (0.26) y COX-2 (0.70)	COX-1(0.96) y COX-2 (0.91)	COX 1 y 2
Ácido mefenámico	4	AKR1C3 (1)	COX-1(0.22) y COX-2 (0.12)	AKR1C3, COX 1 y 2
	5	AKR1C3 (0.41)	COX-1(0.23) y COX-2 (0.13)	AKR1C3, COX 1 y 2
	6	AKR1C3 (0.31)	COX-1(0.28) y COX-2 (0.13)	AKR1C3, COX 1 y 2
Diclofenaco	7	AKR1C3 (0.13), COX-1(0.13) y COX-2 (0.7)	COX-1(0.31) y COX-2 (0.17)	AKR1C3, COX 1 y 2
	8	COX-2 (0.10)	COX-1(0.31) y COX-2 (0.17)	COX 1 y 2
	9	AKR1C3(0.10) COX-1(0.10) y COX-2(0.10)	COX-1(0.36) y COX-2 (0.18)	AKR1C3, COX 1 y 2
Ibuprofeno	10	COX-1(0.11) y COX-2 (0.11)	COX-1(0.41) y COX-2 (0.16)	COX 1 y 2
	11	N/A	COX-1(0.42) y COX-2 (0.16)	COX 1 y 2
	12	N/A	COX-1(0.47) y COX-2 (0.17)	COX 1 y 2
Indometacina	13	AKR1C3(0.82), COX-1(0.76) y COX-2 (0.76)	COX-1(0.45) y COX-2 (0.27)	AKR1C3, COX 1 y 2
	14	AKR1C3(0.24), COX-1(0.13) y COX-2 (0.15)	COX-1(0.40) y COX-2 (0.26)	AKR1C3, COX 1 y 2
	15	AKR1C3(0.21), COX-1(0.14) y COX-2(0.16)	COX-1(0.45) y COX-2 (0.27)	AKR1C3, COX 1 y 2

Los resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica y en la predicción con plataformas online de blancos moleculares involucrados en cáncer permiten seleccionar los blancos moleculares en común y más representativos para el acoplamiento molecular con las moléculas **1–15**: Tubulina, AKR1C3, COX-1 y COX-2.

8.3. Predicción de propiedades de los derivados híbridos de compuestos AINEs y combretastatina A4

8.3.1. SwissADME

Con el uso de la plataforma en línea SwissADME se logró predecir las propiedades de los derivados **1–15** y de los fármacos cabeza de serie. Estos datos permiten realizar una comparación entre los híbridos y los compuestos líderes, las propiedades fisicoquímicas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de las moléculas **1–15** y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en SwissADME

Molécula	Formula	P.M. (g/mol)	Fracc. C sp3	N° en. rotables	N° en. H aceptores	N° en. H donadores	Refractividad molar	TPSA (Å ²)
CA-4	C ₁₈ H ₂₀ O ₅	316.35	0.22	6	5	1	89.8	57.15
Celecoxib	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S	381.37	0.12	4	7	1	89.96	86.36
1	C ₁₆ H ₁₂ F ₃ N ₃ O ₂ S	367.35	0.06	4	7	1	85	86.36
2	C ₁₉ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₅ S	457.42	0.21	7	10	1	104.47	114.05
3	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄ S	413.37	0.12	5	9	2	93.51	115.82
Ácido mefenámico	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	241.29	0.13	3	2	2	72.88	49.33
4	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	213.23	0	3	2	2	62.95	49.33
5	C ₁₆ H ₁₇ NO ₅	303.31	0.19	6	5	2	82.42	77.02
6	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	259.26	0.07	4	4	3	71.46	78.79
Diclofenaco	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296.15	0.07	4	2	2	77.55	49.33
7	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂	227.26	0.07	4	2	2	67.53	49.33
8	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317.34	0.24	7	5	2	87.01	77.02
9	C ₁₅ H ₁₅ NO ₄	273.28	0.13	5	4	3	76.05	78.79
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.28	0.46	4	2	1	62.18	37.3

10	$C_{19}H_{23}NO_2$	297.39	0.32	6	2	2	91.72	49.33
11	$C_{22}H_{29}NO_5$	387.47	0.41	9	5	2	111.2	77.02
12	$C_{20}H_{25}NO_4$	343.42	0.35	7	4	3	100.24	78.79
Indometacina	$C_{19}H_{16}ClNO_4$	357.79	0.16	5	4	1	96.12	68.53
13	$C_{19}H_{17}NO_4$	323.34	0.16	5	4	1	91.11	68.53
14	$C_{22}H_{23}NO_7$	413.42	0.27	8	7	1	110.59	96.22
15	$C_{20}H_{19}NO_6$	369.37	0.2	6	6	2	99.63	97.99

Como se observa en la Tabla 4, se obtuvieron diversos parámetros importantes para esta evaluación, algunas de estas propiedades son consideradas en las reglas de semejanza a fármacos cabeza de serie y los criterios químico farmacéuticos como las reglas de Lipinski (Lipinski C., 1997; Teague S., 1999).

El peso molecular es un descriptor importante para la evaluación de propiedades, diversos autores han realizado investigaciones comparando bases de datos de fármacos, determinando el rango de peso molecular de una molécula para que pueda ser un candidato a fármaco. Lipinski menciona que las moléculas deben tener un peso molecular menor o igual a 500 g/mol, Ghose indica que el peso molecular adecuado debe de entrar en un rango de 160 a 480 g/mol y Muegge menciona que el rango de este descriptor es entre 200 y 600 g/mol (Ghose A., 1999; Lipinski C., 1997; Muegge I., 2001). Como se muestra en la Tabla 4, todas las moléculas evaluadas caen dentro de los rangos propuestos por estos autores, por lo que es un primer indicio de que las moléculas evaluadas pueden ser candidatos a fármacos.

Otro de los parámetros fisicoquímicos más relevante es la fracción de carbonos con hibridación sp^3 , es decir, la fracción de carbonos alifáticos presentes en la molécula; este descriptor molecular es importante ya que, debido a su estructura tridimensional, la molécula puede propiciar una mejor actividad con los blancos terapéuticos; los efectos sobre la arquitectura molecular podrían permitir interacciones mejoradas con la diana, mejorando la potencia, especificidad y/o eficacia del candidato a fármaco, aumentando la probabilidad de que conduzca a un desarrollo de un fármaco exitoso. Algunos autores indican que una fracción de

carbono sp³ mayor a 0.25 podría permitir una mejor interacción de la molécula con el blanco terapéutico (Lovering F., 2009). Las moléculas que obtuvieron una fracción sp³ mayor a 0.25 son las moléculas **10-12** y **14**, esta información permite predecir que, con base en este criterio, estas moléculas podrían presentar una mejor interacción con los blancos a evaluar. Sin embargo, como se muestra en la tabla, los fármacos líderes, a excepción del ibuprofeno, presentan una fracción menor a la indicada en la literatura, por lo que este parámetro no debe ser tomado como un parámetro de exclusión de moléculas.

Otro descriptor molecular importante para determinar si la molécula evaluada puede ser un buen candidato a fármaco es el número de enlaces rotables, de igual manera, autores han planteado el número de enlaces rotables adecuado, Veber planteó que las moléculas deben poseer menos de diez enlaces rotables para poder tener una alta probabilidad de presentar una buena biodisponibilidad oral, estos estudios se hicieron en ratas y en membranas artificiales (Veber D., 2002). Muegge propone que las moléculas deben de contener menos de quince enlaces rotables para ser buenos candidatos a fármacos (Muegge I., 2001). Los resultados obtenidos en la predicción indican que todas las moléculas evaluadas cumplen con este criterio, por lo que es otro indicio de que las moléculas evaluadas pueden ser buenos candidatos a fármacos.

Los descriptores moleculares que indican el número de aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno también son de gran relevancia, estos indican la presencia de grupos N u O, en el caso de aceptores, y NH u OH, en el caso de donadores, dentro de las moléculas evaluadas. La presencia de estos grupos es importante ya que estos permiten la interacción con dianas y podrían influir en una mala absorción o permeación (Bian L., 2003). Lipinski menciona que para evitar que las moléculas tengan una baja o nula absorción deben de presentar menos de cinco donantes y menos de diez aceptores de enlaces de hidrógeno (Lipinski C., 1997). Al igual que Lipinski, Muegge propone que las moléculas que presentan menos de cinco donadores y menos de diez aceptores de enlaces de hidrógeno pudieran presentar una buena absorción o permeación (Muegge I., 2001). Los resultados obtenidos

indican que todas las moléculas evaluadas cumplen con esta propuesta, por lo que, de igual manera, este es otro indicio de que las moléculas pueden ser buenos candidatos a fármacos en relación con su permeación y absorción.

Según Ghose, la refractividad molar podría propiciar información predictiva sobre la capacidad de las moléculas de interactuar de una mejor manera con la diana terapéutica, los valores óptimos de este descriptor están dentro del rango 40–130 (Ghose A., 1999). Todas las moléculas, excepto el ibuprofeno, obtuvieron valores dentro del rango sugerido por Ghose, lo que indica que las moléculas podrían tener buena interacción con las dianas terapéuticas. Sin embargo, la refractividad molar del ibuprofeno no cae dentro del rango propuesto por Ghose, por lo que, al igual que la fracción sp^3 , este parámetro no debe ser tomado como único parámetro de exclusión de moléculas, ya que el ibuprofeno es un fármaco aprobado debido a la eficacia y seguridad que presentó en los estudios preclínicos y clínicos realizados.

El último descriptor molecular presentado en la Tabla 4 es el área de superficie polar topológica (TPSA por sus siglas en inglés). El TPSA es una métrica de química farmacéutica de uso común para la optimización de la capacidad de un fármaco para penetrar en las células. Algunos autores indican que las moléculas con un área de superficie polar de más de 140 angstroms cuadrados tienden a ser deficientes para penetrar las membranas celulares. Para que las moléculas penetren la barrera hematoencefálica, y actúen sobre los receptores del sistema nervioso central, generalmente se necesita un TPSA menor a 90 angstroms al cuadrado (Pajouhesh H., 2005). Los resultados obtenidos indican que todas las moléculas evaluadas presentan un TPSA menor a 140, por lo que, según este parámetro, las moléculas evaluadas podrían penetrar de manera eficiente las membranas celulares. Sin embargo, algunas de las moléculas presentan TPSA menores a 90 angstroms al cuadrado, indicando que podrían permear la barrera hematoencefálica, por lo que, en el caso de la finalidad de nuestros fármacos, esta es una medida no tan conveniente ya que los tejidos a los que se desea llegar no están presentes más allá de la barrera hematoencefálica, esto podría propiciar la presencia de efectos no deseados.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros farmacocinéticos obtenidos de la predicción de propiedades con la plataforma SwissADME.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos de las moléculas 1–15 y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en SwissADME

Molécula	Abs. GI	Perm. BHE	Sus. P-gp	Inhibidor CYP1A2	Inhibidor CYP2C19	Inhibidor CYP2C9	Inhibidor CYP2D6	Inhibidor CYP3A4
CA-4	Alto	Si	No	Si	Si	Si	Si	Si
Celecoxib	Alto	No	No	Si	No	Si	No	No
1	Alto	No	No	Si	No	No	No	No
2	Bajo	No	No	Si	No	Si	Si	Si
3	Bajo	No	No	Si	No	No	No	Si
Ácido mefenámico	Alto	Si	No	Si	No	Si	Si	No
4	Alto	Si	No	Si	No	Si	No	No
5	Alto	Si	No	Si	No	Si	No	No
6	Alto	Si	No	Si	No	Si	No	No
Diclofenaco	Alto	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
7	Alto	Si	No	No	No	No	No	No
8	Alto	Si	No	Si	No	Si	Si	No
9	Alto	Si	No	Si	No	Si	Si	No
Ibuprofeno	Alto	Si	No	No	No	No	No	No
10	Alto	Si	Si	No	Si	Si	Si	No
11	Alto	No	Si	No	Si	Si	No	No
12	Alto	No	Si	No	Si	Si	Si	No
Indometacina	Alto	Si	No	Si	Si	Si	No	No
13	Alto	Si	No	Si	Si	Si	No	No
14	Alto	No	No	No	Si	Si	No	No
15	Alto	No	No	No	No	Si	No	No

Como se observa en la Tabla 5, todas las moléculas presentan una permeabilidad alta en la barrera gastrointestinal, este parámetro es importante ya que una buena

permeabilidad en esta barrera permite una mejor absorción vía oral del fármaco, por lo que este podría tener una buena biodisponibilidad (Salvo E., 2015).

Como se mencionaba anteriormente en la descripción del TPSA, algunas moléculas, según la predicción, pueden atravesar la barrera hematoencefálica, siendo un efecto que no se desea por parte de las moléculas evaluadas, sin embargo, este efecto debe de ser evaluado *in vivo* para determinar si efectivamente el paso de las moléculas por la barrera hematoencefálica produce efectos no deseados.

La predicción de la unión a P-gp se refiere a la capacidad de las moléculas de ser sustrato de esta proteína, que es de gran relevancia ya que es una bomba de flujo de salida de compuestos xenobióticos con amplia especificidad de sustrato, debido a esto, es responsable de la disminución de la acumulación del fármaco en células resistentes a múltiples fármacos, y a menudo interviene en el desarrollo de resistencia a los fármacos contra el cáncer (Aller S., 2009). Según la predicción, a excepción de las moléculas **10-12**, todas las moléculas analizadas no son sustrato de esta proteína, por lo que disminuye la probabilidad de presentar resistencia a dichas moléculas. Por otro lado, los derivados de ibuprofeno **10-12**, según la predicción, son sustrato de esta proteína, esto podría propiciar el desarrollo de resistencia a estas moléculas, sin embargo, al igual que el paso a través de la barrera hematoencefálica, la unión a esta proteína debe de evaluarse *in vitro* e *in vivo* para determinar si esta unión será un factor determinante para la resistencia a estas moléculas.

Por otro lado, en la Tabla 5 también se muestran los resultados de la predicción de la capacidad de las moléculas estudiadas para inhibir a enzimas metabolizadoras de fármacos, otras moléculas xenobióticas o componentes tóxicos derivados del metabolismo, estas enzimas son las responsables de la fase oxidativa o fase I del metabolismo. Estas enzimas forman parte de la super familia citocromo p450, debido a su función, la inhibición de estas podría generar interacciones farmacológicas no deseadas, efectos adversos no deseados, o incluso,

acumulación de otros fármacos debido a su escasa eliminación propiciando una sobredosis por parte de estos fármacos no metabolizados (Guengerich F., 2008). Cada subtipo de enzima tiene características específicas en relación a las sustancias que metaboliza y su presencia en los tejidos, por ejemplo, la CYP1A2 representa alrededor del 13% de la cantidad total de citocromo detectado en el hígado, otro ejemplo es la CYP3A4 que es una de las enzimas más importantes debido a que es la principal responsable del metabolismo de fármacos (González R., 2002; Watkins P., 1994). El análisis de estos resultados puede resultar un tanto confuso ya que, a excepción de la molécula **7** y el ibuprofeno, según la predicción, tanto las moléculas evaluadas, como los fármacos cabeza de serie, inhiben alguna de estas enzimas metabolizadoras, esta información indica que la inhibición por parte de las moléculas analizadas pudiera generar problemas de toxicidad. Sin embargo, como ya se ha mencionado, fármacos cabeza de serie resultan inhibidores de alguna de estas enzimas, por lo que la predicción de la inhibición de alguna de las enzimas por parte de las moléculas no debe de ser tomado como criterio único su exclusión, ya que, comparado con los fármacos aprobados y evaluados toxicológicamente que presentan una inhibición, estas moléculas podrían ser buenos candidatos. Para determinar si existen efectos adversos significativos debidos a una inhibición de enzimas metabolizadoras es necesario realizar estudios *in vivo*.

La última predicción en la plataforma SwissADME corresponde a los parámetros químico-farmacéuticos clásicos presentes en las moléculas **1-15** y los fármacos cabeza de serie, estos resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Lipofilia, solubilidad y parámetros químico-farmacéutico de las moléculas **1-15** y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en SwissADME

Molécula	Consenso log P	Log S y solubilidad consenso	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Biodisp.	PAINS	Brenk	Leadlikeness
CA-4	3.31	-4.55 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.55	0	1 (estilbeno)	No (XLogP3>3.5)
Celecoxib	3.40	-5.22 Moderadamente soluble	Si	No	Si	Si	Si	0.55	0	0	No (P.M.>350)

1	2.97	-4.87 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.55	0	0	No (P.M.>350)
2	3.01	-5.21 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.55	0	0	No (P.M.>350)
3	2.62	-4.76 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.55	0	0	No (P.M.>350)
Ácido mefenámico	3.29	-5.29 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	No	0.85	0	0	No (P.M.<250) (XLogP3>3.5)
4	2.58	-4.57 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.85	0	0	No (P.M.<250) (XLogP3>3.5)
5	2.57	-5.03 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	No (XLogP3>3.5)
6	2.19	-4.58 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	No (XLogP3>3.5)
Diclofenaco	3.66	-5.25 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.85	0	0	No (XLogP3>3.5)
7	2.73	-4.22 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.85	0	0	No (P.M.<250)
8	2.80	-4.74 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	No (XLogP3>3.5)
9	2.39	-4.19 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	Si
Ibuprofeno	3.04	-3.59 Soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.85	0	0	No (P.M. <250)
10	4.22	-5.58 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	No	0.85	0	0	No (XLogP3>3.5)
11	4.16	-5.93 Moderadamente Soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	No (P.M. >350) (Enl rot. >7) (XLogP>3.5)
12	3.85	-5.47 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	No (XLogP3>3.5)
Indometacina	3.63	-5.35 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.85	0	0	No (P.M. >350) (XLogP>3.5)
13	3.08	-4.74 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.85	0	0	No (XLogP3>3.5)
14	3.03	-5.09 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	No (P.M. >350) (Enl rot. >7) (XLogP>3.5)
15	2.74	-4.63 Moderadamente soluble	Si	Si	Si	Si	Si	0.56	0	0	No (P.M.>350)

Además de los resultados obtenidos en la predicción de las propiedades químico-farmacéuticos, la Tabla 6 también muestra los parámetros de consenso del coeficiente de reparto o partición octanol/agua ($\log P$) y el consenso de la solubilidad ($\log S$).

El coeficiente de partición o reparto se refiere a la solubilidad diferencial de una sustancia en dos disolventes, en este caso en octanol y agua. Por lo tanto, al utilizar estos dos disolventes como referencia, el $\log P$ indica la lipofilia de una molécula y a su vez, su capacidad de distribución en las bicapas lipídicas de las células (Pliska V., 1996). El consenso $\log P$ se obtiene de sacar un promedio de los distintos descriptores de lipofilia obtenidos en la predicción, los descriptores promediados son ilogP , XlogP3 , WlogP , MlogP y SILICOS-IT (Cheng T., 2007; Daina A., 2014; Moriguchi I., 1994; Silicos-it, 2012; Wildman S., 1999). Algunos autores plantean que para que una molécula tenga propiedades lipofílicas favorables, el $\log P$ debe de ser menor a un valor de 5.0 (Lipinski C., 1997). Por lo que, según la predicción, la totalidad de moléculas evaluadas tienen un valor consenso de $\log P$ debajo del valor de referencia propuesto por Lipinski, indicando que las moléculas podrían poseer características lipofílicas adecuadas para una buena permeación en las células, pudiendo llegar así al blanco terapéutico de interés.

Por otro lado, el consenso de la solubilidad se obtiene al promediar tres descriptores moleculares que predicen la solubilidad de las moléculas en agua, el $\log S$ (ESOL), $\log S$ (Ali) y $\log S$ (Silicos-it) (Ali J., 2012; Delaney, 2004; Silicos-it, 2012). Algunos autores plantean un rango de $\log S$ que indica la solubilidad de las moléculas en agua, las moléculas muy solubles caen dentro de un rango de $\log S$ mayor a -2, moléculas solubles presentan un $\log S$ dentro del rango de -2 a -4, las moderadamente solubles entre -4 a -6; según el portal de química orgánica, alrededor del 80% de los fármacos aprobados están dentro de este rango; las moléculas poco solubles entre -6 a -10 y las insolubles con un valor de $\log S$ menor a -10 (Daina A., 2017; Organic Chemistry Portal, 2021; Wang J., 2011). Los resultados obtenidos, según la predicción, indican que todas las moléculas evaluadas, a excepción del ibuprofeno, se encuentran en un rango de $\log S$ de -4 a

-6, indicando que estas moléculas son moderadamente solubles, por lo que se puede predecir que no tendrán mayores problemas de solubilidad en agua. Esta información es de gran relevancia debido a que la solubilidad en agua es una propiedad intrínseca, es decir, depende de la estructura molecular, por lo tanto, los resultados obtenidos permiten determinar que las moléculas presentan una estructura molecular adecuada para evitar problemas de solubilidad en agua.

Además del consenso $\log P$ y $\log S$, la Tabla 6 muestra la predicción de los parámetros químico-farmacéuticos presentes en las moléculas. Estos descriptores están sustentados con la investigación realizada por científicos reconocidos. La regla de 5 de Lipinski (Pfizer) es una regla empírica que permite evaluar cualitativamente lo adecuado que podría ser un compuesto químico para ser absorbido y ejercer alguna actividad biológica. La regla de 5 de Lipinski menciona que para que una molécula presente una absorción o permeación adecuada debe de cumplir con ciertos parámetros: menos de cinco donadores de hidrógeno, menos de diez aceptores de hidrógeno, tener un peso molecular menor a 500 g/mol y un $\log P$ menor a 5 (Lipinski C., 1997). Según la predicción, todas las moléculas evaluadas cumplen con la regla de los 5 de Lipinski, por lo que es otro indicio de que las moléculas evaluadas podrían ser buenos candidatos a fármacos.

En el año 1999, Ghose indicó otra serie de parámetros importantes que permiten predecir si las moléculas serán buenos candidatos a fármacos, al igual que el método de Lipinski, el método de Ghose también es empírico. Este método indica que para que una molécula pueda ser buen candidato a fármaco debe de cumplir los siguientes parámetros: tener un $\log P$ entre -0.4 y -5.6, tener un peso molecular dentro del rango de 160 a 480 g/mol, una refractividad molar entre 40 y 130, y tener un número de átomos dentro del rango de veinte a setenta (Ghose A., 1999). Como se muestra en los resultados, todas las moléculas, a excepción del celecoxib, cumplen con estos parámetros, por lo que, según la predicción en el método de Ghose, las moléculas evaluadas pudieran ser buenos candidatos a fármacos.

Otro de los descriptores utilizados para determinar la probabilidad de las moléculas a ser buenos candidatos a fármacos es el método de Veber (GSK), el cual describe

la capacidad de las moléculas de presentar una buena biodisponibilidad oral. Veber menciona que para que una molécula presente una buena biodisponibilidad oral debe de cumplir con los siguientes parámetros: presentar menos de diez enlaces rotables y una TPSA menor a 140 angstroms al cuadrado (Veber D., 2002). Como se puede mostrar en los resultados, según la predicción, la totalidad de las moléculas cumplen con estos parámetros, por lo que, al igual que los descriptores antes analizados, indican que las moléculas evaluadas pueden ser buenos candidatos a fármacos al cumplir este método y por lo tanto poder presentar una buena biodisponibilidad oral.

Por su parte, Egan en el año 2000 presentó un método que permite identificar, de manera cualitativa, si las moléculas presentarán buena absorción. En su método, Egan propone que para que una molécula pueda tener una buena absorción debe de presentar un wlogP menor o igual a 5.88 y una TPSA menor o igual a 131.6 angstroms al cuadrado (Egan W., 2000). Los resultados obtenidos indican que, a excepción del ácido mefenámico, todas las moléculas evaluadas cumplen con estos valores, por lo que, según la predicción, las moléculas evaluadas podrían tener una buena absorción y por lo tanto ser buenos candidatos a fármacos.

El puntaje de biodisponibilidad está basado en un método realizado por Martin en 2005, este puntaje evalúa diferentes descriptores moleculares como la TPSA para determinar la probabilidad de que una molécula tenga una biodisponibilidad mayor al 10% en ratas. Las probabilidades que se presentan en este método son 0.85, 0.56 y 0.11 (Martin Y., 2005). Los resultados indican que ninguna molécula presenta una probabilidad de 0.11 de tener una biodisponibilidad mayor al 10%, por el contrario, las moléculas **4**, **7**, **10** y **13** presentan una probabilidad del 0.85 de tener una biodisponibilidad mayor a 10% en ratas. Las moléculas restantes tienen una probabilidad del 0.56. Por lo que, según la predicción, se puede sugerir que las moléculas evaluadas podrían presentar una buena biodisponibilidad y por lo tanto ser buenos candidatos a fármacos.

En 2010, Bael y Holloway publicaron un informe en donde describían una serie de características subestructurales que permiten identificar compuestos que pueden

arrojar actividad/respuesta falsa en estudios (PAINS), estos compuestos tienden a reaccionar inespecíficamente con numerosos objetivos biológicos en lugar de afectar específicamente a un objetivo deseado (Bael J., 2010). Este es un efecto no deseado en las moléculas, ya que se pretende identificar blancos moleculares específicos en donde las moléculas puedan ejercer su efecto terapéutico. La predicción indica que ninguna de las moléculas evaluadas presenta características subestructurales que las identifique como uno de estos compuestos, por lo que, al igual que con otros descriptores, esto es otro indicio de que las moléculas evaluadas pueden ser buenos candidatos a fármacos.

El descriptor molecular “alertas Brenk” está basado con el método que lleva el mismo nombre; este investigador realizó un estudio comparativo en donde se definieron 105 fragmentos que podrían ser supuestamente tóxicos, químicamente reactivos, metabólicamente inestables o tener propiedades responsables de una farmacocinética deficiente. Algunos de estos grupos son los nitro, tioles, entre otros (Brenk R., 2008). Los resultados obtenidos en la predicción indican que la única molécula que tiene una alerta Brenk es la combretastatina A4, la alerta se refiere al grupo estilbeno presente en esta. Sin embargo, las moléculas evaluadas **1-15** no presentan alerta alguna, por lo que, según esta predicción, no contienen grupos estructuralmente desfavorables y, por lo tanto, es otro indicio más de que pueden ser buenos candidatos a fármacos.

El último descriptor molecular mostrado en la Tabla 6 es “leadlikeness” que se refiere al parecido con fármacos líderes, este descriptor se centra en los límites fisicoquímicos que definen una entidad molecular adecuada para la optimización, es decir, este descriptor, basado con el método de Teague, evalúa la capacidad de las moléculas para ser compuestos líderes y por lo tanto, la capacidad de ser optimizados con modificaciones estructurales posteriores (Daina A., 2017; Teague S., 1999). Los resultados obtenidos en la predicción indican que solamente la molécula **9** tiene las características necesarias para poder ser un compuesto líder, el resto de las moléculas no se encuentran dentro de los rangos planteados por Teague, esto era de esperarse, ya que, las moléculas evaluadas son derivados de

compuestos líderes, por lo que estas moléculas han sufrido modificaciones en relación a su compuesto líder, aunque la mayoría de las moléculas no cumplen con los parámetros para poder ser candidatos a ser líderes, al ser derivados híbridos, este descriptor no afecta en la toma de decisiones para seguir con la evaluación de los compuestos. Además, estos resultados indican que los compuestos líderes presentados tampoco cumplen los parámetros propuestos para identificarse como líderes, sin embargo, algunos de ellos, como la combretastatina A-4, se han identificado como compuestos cabeza de serie.

En resumen, a partir de la predicción de las propiedades farmacológicas de las moléculas **1-15**, se identificó que ninguna de estas presenta alertas significativas que indiquen detener su desarrollo como candidatos a fármacos. Como se mencionó, las únicas alertas relevantes que se obtuvieron fueron en la farmacocinética y la inhibición de enzimas metabolizadoras de fármacos, sin embargo, al utilizar como referencia a fármacos aprobados, se pudo hacer una comparación entre las moléculas a evaluar y los líderes, observando que tanto los líderes como las moléculas evaluadas presentan inhibición en al menos una de las enzimas metabolizadoras de fármacos; como se mencionó, esto indica que esta predicción no debe de ser tomado como criterio único de exclusión de moléculas, permitiendo seguir con el desarrollo de las mismas hasta determinar en modelos *in vitro* o *in vivo*, si realmente pudieran presentar problemas toxicológicos al inhibir alguna de las enzimas metabolizadoras de fármacos.

8.3.2. OSIRIS DataWarrior

Para hacer una comparación de las propiedades de las moléculas se utilizó el programa predictor OSIRIS, los resultados obtenidos de la predicción de las propiedades farmacológicas de las moléculas **1-15** y los fármacos cabeza de serie se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros farmacológicos de las moléculas 1–15 y de los fármacos cabeza de serie obtenidas en OSIRIS

Molécula	Mutagénico	Tumorigénico	Irritante	Efecto reproductivo	Druglikeness
CA-4	No	No	No	Si	4.56
Celecoxib	No	No	No	No	-8.11
1	No	No	No	No	-7.03
2	No	No	No	No	-4.15
3	No	No	No	No	-6.14
Ác. mefenámico	No	No	Si	Si	0.41
4	No	No	No	No	-1.14
5	No	No	No	No	2.45
6	No	No	No	No	0.03
Diclofenaco	No	No	No	Si	2.06
7	No	No	No	No	-0.71
8	No	No	No	No	2.79
9	No	No	No	No	0.42
Ibuprofeno	Si	No	No	Si	3.97
10	No	No	No	No	0.37
11	No	No	No	No	3.63
12	No	No	No	No	1.33
Indometacina	No	No	No	No	9.41
13	No	No	No	No	8.22
14	No	No	No	No	13.76
15	No	No	No	No	8.94
Riesgo muy bajo		Riesgo bajo		Riesgo moderado	Riesgo alto

Una ventaja de este programa es que los valores son clasificados en un sistema de riesgo representado por colores, siendo el verde el color que presenta menor riesgo de tener propiedades no deseadas, siguiendo por el amarillo, naranja, hasta llegar al color rojo, el cual representa un mayor riesgo; otra ventaja es que al final de la evaluación de los parámetros, el programa arroja una puntuación o score que indica la viabilidad de las moléculas para ser buenos candidatos a fármacos.

El primer parámetro es la capacidad de las moléculas de presentar mutagénesis, este término se refiere a la capacidad de las moléculas de producir mutaciones en el ADN, los compuestos pueden presentar tres mecanismos de acción para generar este efecto: compuestos análogos de nucleótidos, agentes intercalantes y agentes que reaccionan con el ADN (Benavides F., 2003). Según la predicción, la única molécula evaluada que tiene un riesgo de presentar mutagénesis es el ibuprofeno, sin embargo, como ya se ha explicado, este fármaco está aprobado, se conocen sus efectos adversos y es de los más utilizados en todo el mundo; ninguna de las moléculas **1-15** presenta alerta con respecto a este parámetro.

La capacidad de presentar tumorigénesis se refiere a la capacidad de las moléculas de generar o participar en la generación de tumores, estos son la primera etapa para desarrollar el cáncer, por lo que, es deseable que las moléculas candidatas a fármacos no tengan un riesgo de presentar este efecto. Esto puede darse por la pérdida de actividad en genes supresores de tumores o por la activación de oncogenes (Lozano G., 1998). La predicción indica que ninguna de las moléculas evaluadas tiene riesgo de presentar este efecto.

Otro parámetro presentado en los resultados es el efecto irritante, este se refiere a la capacidad de las moléculas para generar irritación local, la irritación es un estado inflamatorio del organismo causado principalmente por algún tipo de alergia a agentes químicos o a otros estímulos (INSST, 2021). Según la predicción, únicamente el ácido mefenámico presenta este efecto, por lo que, las moléculas evaluadas no tienen riesgo de presentar esta consecuencia no deseada.

El último de los parámetros es el efecto reproductivo, este está asociado a compuestos que intervienen con la reproducción normal; estas sustancias pueden afectar negativamente la función sexual y la fertilidad en machos y hembras adultos, además de causar toxicidad en el desarrollo de la descendencia (WHO, 2001). Como se muestra en la Tabla 7, según la predicción, las únicas moléculas que pudieran presentar un efecto reproductivo son los fármacos cabeza de serie: CA-4, ácido mefenámico, diclofenaco e ibuprofeno. Aunque esta predicción indica que estos fármacos pudieran presentar este efecto, a excepción de la CA-4, estas moléculas ya se encuentran aprobadas. Por otro lado, ninguna de las moléculas **1-15** presentaron algún riesgo de generar este efecto, por lo cual, en relación con estos parámetros, todas son buenos candidatos a fármacos.

El término “druglikeness” hace referencia a la similitud estructural de las moléculas evaluadas con respecto a fármacos, es un concepto cualitativo que se utiliza para determinar qué tan similar es una sustancia a fármacos, con respecto a ciertos factores como la biodisponibilidad, solubilidad en agua, lipofilia, potencia en objetivos biológicos, eficacia del ligando y peso molecular. La predicción en DataWarrior arroja un valor numérico que depende de las subestructuras presentes en las moléculas, mientras mayor sea el valor indicado, mayor será la similitud con fármacos (Jia C., 2019). La predicción indica que las únicas moléculas que presentan un valor negativo, y por lo tanto presentan poca o nula similitud con fármacos, son el celecoxib, sus derivados **1-3** y la molécula **7**. Sin embargo, como se sabe, el celecoxib es un fármaco aprobado y muy utilizado, por lo que, estos valores obtenidos no son un criterio de exclusión para estas moléculas. Por otro lado, como se observa en los resultados, de acuerdo con los valores obtenidos, las demás moléculas evaluadas y sus fármacos cabeza de serie presentan similitud con fármacos, por lo que no genera una alerta significativa para la evaluación.

Por último, la evaluación en el programa DataWarrior permite obtener una puntuación de las moléculas, esta puntuación considera todos los parámetros evaluados en la predicción, la puntuación se encuentra en un rango de 0 a 1, las moléculas que tengan una puntuación más elevada se consideran como buenos

candidatos a fármacos. Según el programa, una puntuación de 0 a 0.25 indica que la molécula evaluada tiene muy baja probabilidad de ser buen candidato a fármaco, un valor de 0.26 a 0.5 indica que la molécula tiene baja probabilidad de ser buen candidato a fármaco, un valor de 0.51 a 0.75 indica que la molécula evaluada tiene alta probabilidad de ser buen candidato a fármaco y un valor de 0.76 a 1 indica que la molécula evaluada tiene muy alta probabilidad de ser buen candidato a fármaco (Tabla 8).

Los resultados indican que, según el valor obtenido con DataWarrior, los derivados de celecoxib **1-3** tienen una baja probabilidad de ser buenos candidatos a fármacos; la mayor parte de las moléculas se encuentran dentro del rango de alta probabilidad, y solamente las moléculas **5** y **8** tienen una muy alta probabilidad, por lo que, según la predicción, se puede determinar que las moléculas **4-15** serán buenos o muy buenos candidatos a fármacos, con respecto a sus propiedades revisadas.

No obstante, estos resultados no permiten excluir a ninguna molécula, incluso a los derivados de celecoxib **1-3**, ya que, haciendo una comparación de los resultados obtenidos tanto en SwissADME como en DataWarrior, ninguna predicción indica una alerta significativa para estas moléculas. Por lo tanto, de acuerdo con esta evaluación, la totalidad de las moléculas **1-15**, podrían desarrollarse a largo plazo como fármacos, permitiendo así, realizar los estudios de acoplamiento molecular con todas las moléculas diseñadas.

Tabla 8. Puntuaciones de las moléculas **1-15** obtenidas en OSIRIS

Rango de puntuación	0 a 0.25 (muy baja probabilidad)	0.26 a 0.50 (baja probabilidad)	0.51 a 0.75 (alta probabilidad)	0.76 a 1 (muy alta probabilidad)
Moléculas	NA	1-3	4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15	5 y 8

8.4. Acoplamiento molecular

Los blancos terapéuticos identificados y utilizados para el acoplamiento molecular fueron la α/β -tubulina, la AKR1C3, COX-1 y COX-2; se seleccionaron las

conformaciones que interactuaban con el sitio de unión de interés y tenían la mejor puntuación, es decir, mejor afinidad. En AutoDock Vina y AutoDock 4.2, los mejores valores se presentan obteniendo una menor energía de unión (Trott O., 2010; Warren G., 2006). En el caso de GOLD, el score chemplp se presenta en una puntuación adimensional del acoplamiento, mientras mayor sea el valor de salida, será mejor la interacción ligando-blanco terapéutico (Jones G., 1997).

8.4.1. Acoplamiento molecular dirigido al sitio de colchicina de la α/β -tubulina

Para el acoplamiento molecular entre las moléculas **1–15** y la α/β -tubulina se seleccionó el sitio de la colchicina, ya que existe evidencia de que la CA-4 tiene afinidad por este sitio (Gaspari R., 2017). En la Tabla 9 se muestran los resultados del acoplamiento molecular entre el ligando cristalizado, el ligando creado y las moléculas **1–15** con la α/β -tubulina, además de mostrar el RMSD obtenido de la validación del método.

Tabla 9. Puntuación del acoplamiento molecular del ligando cristalizado (CA-4), ligando creado (CA-41) y las moléculas **1–15** con el blanco α/β -tubulina utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	AutoDock Vina (ΔG kcal/mol)	AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol)	GOLD (chemplp score)
CA-4	-8.8	-8.42	70.94
CA-41	-8.9	-8.08	73.44
RMSD (CA-4 y CA-41)	0.598	0.702	0.659
1	-7.8	-9.28	64.90
2	-8.0	-9.65	64.81
3	-8.0	-9.89	63.49
4	-8.2	-6.26	61.39
5	-8.1	-6.48	62.85
6	-8.3	-6.43	61.86
7	-8.3	-6.85	65.67
8	-8.2	-6.91	62.90
9	-8.1	-7.12	62.28
10	-9.1	-8.38	78.54
11	-8.1	-8.38	71.50
12	-8.4	-8.47	80.33
13	-7.2	-7.58	59.89
14	-6.5	-7.2	55.39
15	-6.4	-7.13	64.62

Como se puede observar, el docking score obtenido en AutoDock Vina por parte del ligando cristalizado es de -8.8 kcal/mol y la docking score del ligando creado es de -8.9 kcal/mol, además se obtuvo un RMSD de 0.598. Esta información permitió determinar la validación del método, ya que, el ligando creado obtuvo un modo y energía de unión similar a la del ligando cristalizado, aunado al valor de RMSD obtenido, que está dentro de los valores aceptados para validar el procedimiento, es decir, un valor de RMSD menor a 2 (Fan H., 2011). Del mismo modo, la validación del método utilizando AutoDock 4.2 arrojó resultados similares, el docking score del ligando cristalizado fue de -8.42 kcal/mol y la del ligando creado de -8.08 kcal/mol, el RMSD obtenido fue 0.702; evidencia de que se realizó una validación correcta del método. En el caso de GOLD, el *chemplp score* del ligando cristalizado fue 70.94, mientras que el ligando creado obtuvo un *chemplp score* de 73.44 y un RMSD de 0.659, estos valores indican, que al igual que con los otros programas, la validación del método se llevó a cabo de manera adecuada.

Por otro lado, en comparación con las demás series de compuestos, los derivados de ibuprofeno **10–12**, obtuvieron las mejores puntuaciones en dos de los tres programas, por lo que, realizando un consenso de mejores puntuaciones, se procedió a realizar el análisis de interacciones con estas moléculas. En ciertos casos, estas moléculas obtuvieron mejores puntuaciones en comparación con el ligando cristalizado; en AutoDock Vina la molécula **10** obtuvo mejor puntuación, en el caso de AutoDock 4.2 la molécula **12** presentó una mejor puntuación, y en GOLD, las 3 moléculas presentaron una mejor puntuación en comparación con el ligando cristalizado, por lo tanto, es un primer indicio de que estas moléculas presentan una afinidad parecida, o incluso mejor, a la presentada en la molécula cabeza de serie CA-4.

Para hacer el análisis de las interacciones presentes entre las moléculas **10–12** y el blanco α/β -tubulina, se identificaron las interacciones reportadas con el ligando cristalizado de referencia CA-4. Las interacciones presentes del ligando cristalizado CA-4 se resumen en la Tabla 10. Según Gaspari, las interacciones que permiten una estabilidad del ligando son interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno.

Los residuos hidrofóbicos forman un bolsillo en donde las moléculas con características hidrofóbicas podrían interactuar y ser estabilizadas, además, el enlace de hidrógeno aporta una mayor estabilidad al complejo ligando-blanco molecular (Gaspari R., 2017). En la Imagen 12 se puede observar la estructura de la combretastatina A-4, esta presenta dos anillos (A y B) que interactúan de manera hidrofóbica con los residuos presentes en el sitio de la colchicina en la α/β -tubulina.

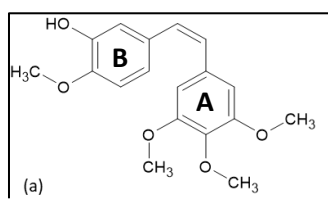


Imagen 12. Estructura en 2D de la combretastatina A-4 identificando los anillos A y B

Tabla 10. Interacciones reportadas en el sitio de unión de la colchicina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4 (Gaspari R., 2017)

Residuo	Tipo de interacción (Anillo)	Residuo	Tipo de interacción (Anillo)
β VAL 238	Hidrofóbica (A)	β ASN 258	Hidrofóbica (B)
β LEU 242	Hidrofóbica (A)	β LYS 352	Hidrofóbica (B)
β LEU 248	Hidrofóbica (A)	α THR 179	Hidrofóbica (B)
β ALA 250	Hidrofóbica (A)	α ALA 180	Hidrofóbica (B)
β LEU 255	Hidrofóbica (A)	α VAL 181	Hidrofóbica (B)
β ALA 316	Hidrofóbica (A)	β MET 259	Hidrofóbica (B)
β ILE 318	Hidrofóbica (A)	β ASN 349	Hidrofóbica (B)
β ALA 354	Hidrofóbica (A)	α THR 179	Enlace Hidrógeno (OH de B)
β ILE 378	Hidrofóbica (A)	α VAL 181	Enlace Hidrógeno (OH de B)

Las interacciones que se obtuvieron por parte del ligando cristalizado CA-4 utilizando el programa AutoDock Vina se pueden observar en la Imagen 13. Se observa que once interacciones son de características hidrofóbicas y una de enlace de hidrógeno. Las interacciones hidrofóbicas encontradas en el anillo "A" y sus sustituyentes trimetoxilo son: β Val 238, β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318 y β Ala 354, mientras que el anillo B y sus sustituyentes hidroxilo y metoxilo interaccionan de manera hidrofóbica con: α Val 181, β Met 259, β Asn 349, β Ala 316 y β Lys 352; y, por último, se encontró un enlace de hidrógeno del grupo hidroxilo del anillo "B" con el grupo OH del carbonilo de la α Thr 179. Se puede observar que cinco de las interacciones presentes en el anillo "A" se presentan con residuos que estabilizan el anillo por interacciones Pi-Sigma y Pi-alquilo, mientras que los grupos metoxilo interactúan con siete residuos por interacciones carbono hidrógeno y alquilo-alquilo, lo que indica que el anillo "A" con los sustituyentes metoxilo permiten una estabilización de la molécula dentro de un bolsillo hidrofóbico. En el caso del anillo "B", presenta tres interacciones con residuos hidrofóbicos que permiten la estabilización del anillo por interacciones Pi-sulfuro por parte de la β Met 259 y Pi-alquilo por parte de los residuos β Lys 352 y β Ala 316, mientras que el grupo metoxilo interactúa con el residuo β Asn 349 por interacción carbono-hidrógeno y alquilo-alquilo con los residuos α Val 181 y β Lys 352, y, por último, el enlace de hidrógeno ya descrito por parte del grupo hidroxilo con la α Thr 179. Este análisis permite determinar que el modo de unión del ligando de referencia CA-4 identificado por acoplamiento molecular es similar al modo de unión identificado por el ligando cristalizado por Gaspari (Gaspari R., 2017).

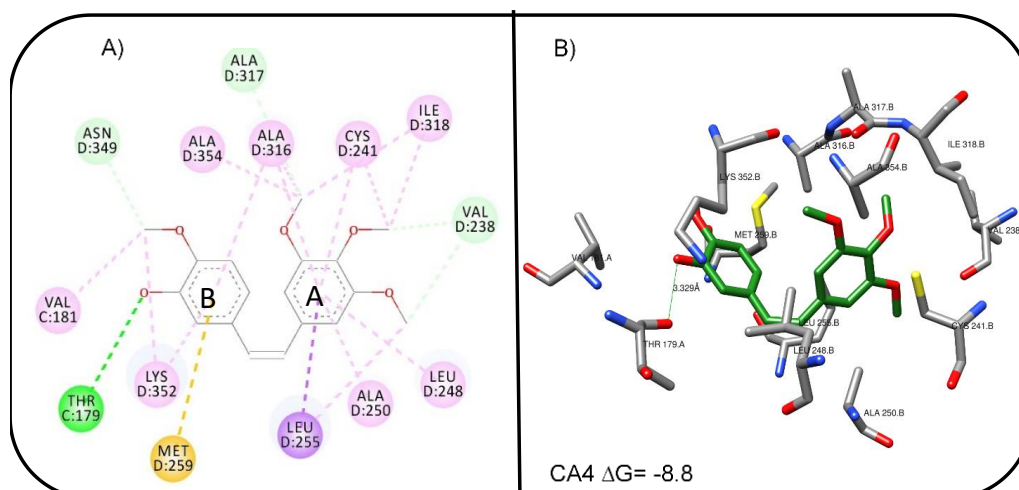


Imagen 13. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4 en 2D, y B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4 en 3D.

Las interacciones encontradas en el acoplamiento molecular entre la molécula **10** y la α/β -tubulina ($\Delta G = -9.1$ kcal/mol) se pueden observar en la Imagen 14. Este compuesto comparte interacciones con el ligando cristalizado, obteniendo ocho interacciones hidrofóbicas y un enlace de hidrógeno. Las interacciones hidrofóbicas son: β Leu 242, β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318 y β Ile 378; en este acoplamiento se encontró un enlace de hidrógeno con β Lys 352, el cual no está reportado. Las interacciones que participan en la estabilización de los anillos de esta molécula son del tipo Pi-sigma y Pi-alquilo, además de interacciones alquilo-alquilo con los sustituyentes alifáticos de la molécula. Por otro lado, el enlace de hidrógeno encontrado se da entre el carbonilo presente en la molécula y el grupo amino de la β Lys 352 (Imagen 14 A y C). En consecuencia, las interacciones hidrofóbicas presentes en la molécula **10** indican que el modo de unión en el sitio de la colchicina es semejante al modo de unión encontrado con el ligando cristalizado CA-4, ya que se identificó una interacción con el bolsillo hidrofóbico formado por los residuos descritos, esto es mostrado en la Imagen 14 B y D (Gaspari R., 2017).

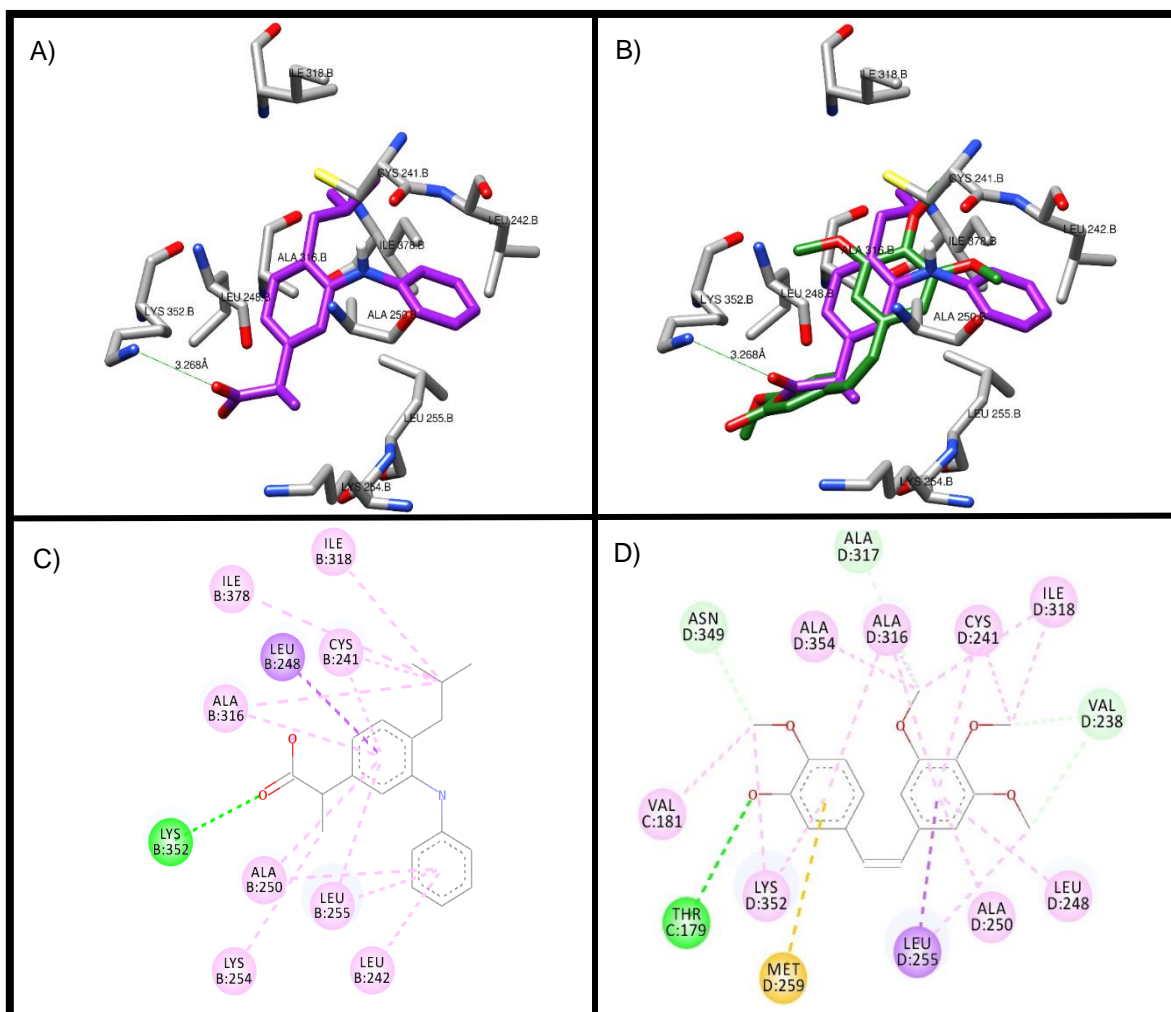


Imagen 14. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **10** (violeta) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **10** (violeta) en presencia del ligando cristalizado CA-4 (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **10** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4 en 2D.

La molécula **11** ($\Delta G = -8.1$ kcal/mol) presenta interacciones con el blanco α/β -tubulina detalladas en la Imagen 15. Al igual que la molécula **10**, el compuesto **11** comparte interacciones con el ligando cristalizado. Presenta nueve interacciones hidrofóbicas y un enlace de hidrógeno, el cual tampoco se encuentra reportado. Las interacciones hidrofóbicas las forma con los residuos: β Leu 248, β Ala 250, β Leu

255, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, α Thr 179, β Met 259 y β Lys 352. Por último, se encontró un enlace de hidrógeno con el residuo β Asn 258, este enlace se da entre el oxígeno de un grupo metoxilo y el OH del carbonilo de la asparagina. Los residuos hidrofóbicos que participan en la estabilización de los anillos forman interacciones de apilamiento Pi-amida con el residuo β Lys 254, del tipo Pi-sigma con los residuos β Leu 348 y β Leu 255, además de interacciones Pi-alquilo con residuos alifáticos. Por otro lado, los grupos alifáticos y metoxilo de la molécula interaccionan con residuos alifáticos de forma alquilo-alquilo y carbono-hidrógeno. En este análisis se encontró que los sustituyentes trimetoxilo presentes en **10** se encuentran invertidos espacialmente en relación con los mismos sustituyentes pertenecientes a CA-4, sin embargo, la energía de unión de esta molécula no se vio afectada, esto puede deberse a que el bolsillo hidrofóbico presente en el sitio de unión de la colchicina estabiliza los anillos y los sustituyentes alifáticos presentes en la molécula (Imagen 15 A y C). Estas interacciones sugieren que el modo de unión de la molécula **11** difiere al modo de unión del ligando cristalizado CA-4, sin embargo, debido a la energía de unión obtenida y a las interacciones hidrofóbicas encontradas, se puede determinar que esta molécula presenta afinidad por este sitio, por lo que podría presentar una actividad biológica descrita para la unión de ligandos en el sitio de colchicina, es decir, podría ejercer un efecto desestabilizante de la elongación de los microtúbulos, esto es mostrado en la Imagen 15 B y D (Gaspari R., 2017).

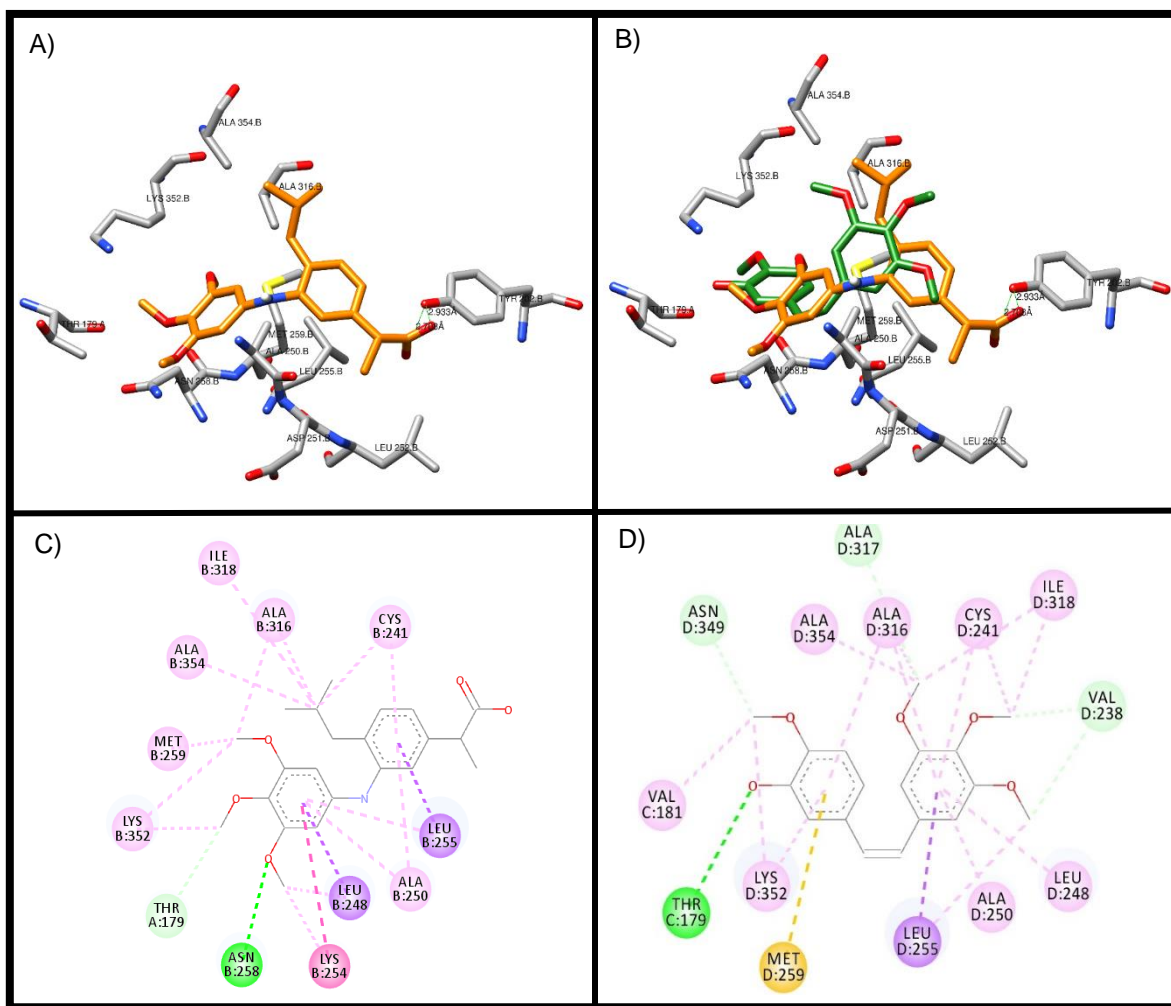


Imagen 15. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **11** (naranja) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **11** (naranja) en presencia del ligando cristalizado CA-4 (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **11** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4 en 2D.

La Imagen 16 muestra las interacciones obtenidas del acoplamiento molecular entre la molécula **12** y el blanco molecular α/β -tubulina ($\Delta G = -8.4$ kcal/mol). Este compuesto presenta ocho interacciones hidrofóbicas y dos enlaces de hidrógeno, uno de estos enlaces ya reportado y uno aún no reportado. Las interacciones hidrofóbicas presentes son: β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, β Met 259 y β Lys 352; un enlace de hidrógeno con el residuo α Val 181

que coincide con lo reportado en la literatura y un enlace de hidrógeno con el residuo β Cys 241 aún no reportado. Las interacciones hidrofóbicas que estabilizan los anillos de la molécula **12** son del tipo Pi-sulfuro con el residuo β Met 259, Pi-sigma con los residuos β Leu 248 y β Leu 255, además de presentar interacciones Pi-alquilo con residuos alifáticos; los sustituyentes alifáticos de la molécula interactúan de manera alquilo-alquilo con residuos alifáticos como β Ala 250 y β Ala 354; también se determinó que el grupo metoxilo interacciona con los residuos α Val 181 y β Lys 352 de manera alquilo-alquilo, además de presentar un enlace de hidrógeno entre el oxígeno de este metoxilo y el grupo amino de α Val 181; el enlace de hidrógeno no reportado se da entre el oxígeno del carboxilato de esta molécula y el grupo tiol de la β Cys 241 (Imagen 16 A y C). Estas interacciones, al igual que las presentes en la molécula **10**, sugieren un modo de unión parecido al del ligando cristalizado CA-4 (Imagen 16 B y D). Por lo tanto, la molécula **12** podría presentar una afinidad parecida a CA-4, pudiendo ocasionar una posible actividad biológica sobre este blanco terapéutico (Gaspari R., 2017).

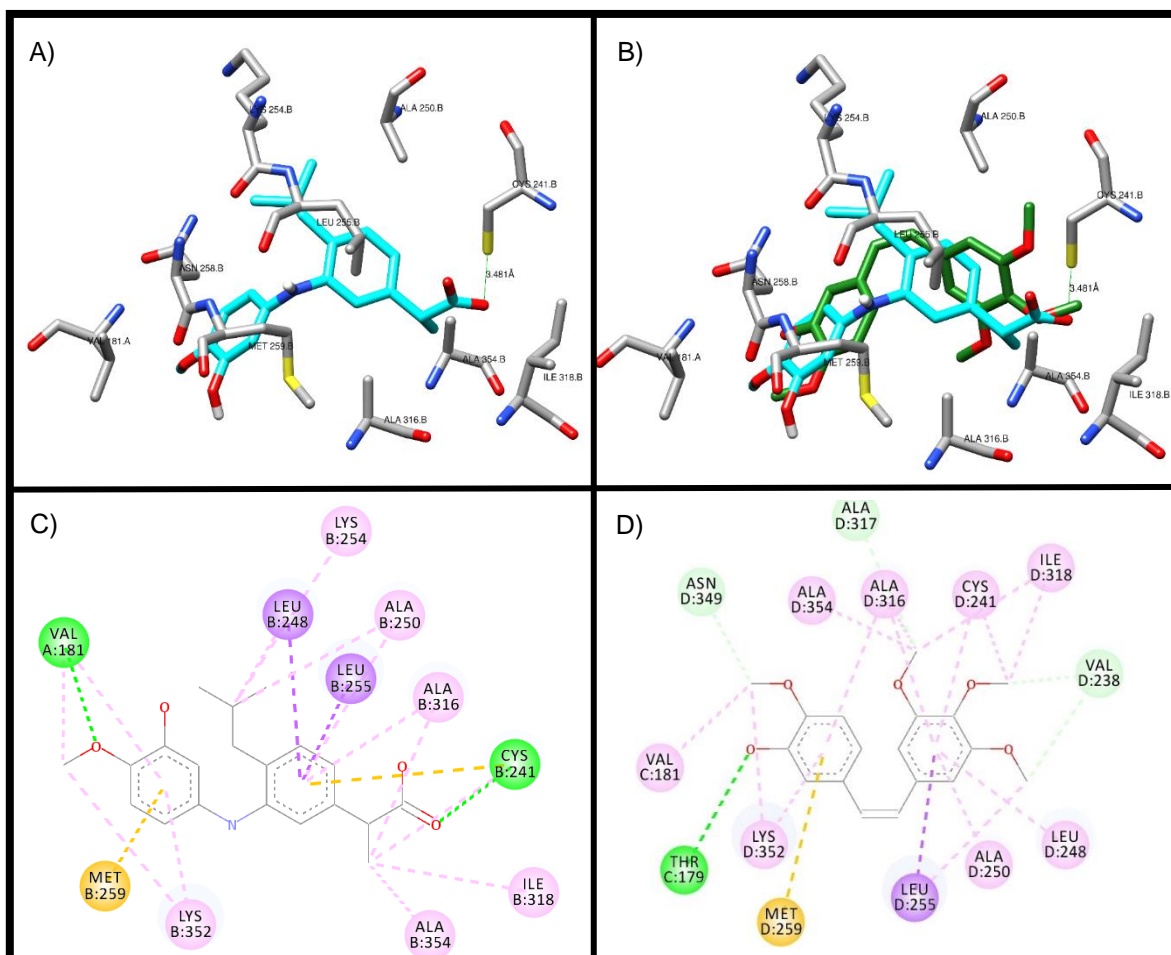


Imagen 16. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **12** (cian) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **12** (cian) en presencia del ligando cristalizado CA-4 (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y la molécula **12** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular α/β -tubulina y el ligando cristalizado CA-4 en 2D.

El análisis de las interacciones presentes entre las moléculas **10-12** y el ligando cristalizado CA-4 con el blanco α/β -tubulina utilizando los programas AutoDock 4.2 y GOLD se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Interacciones presentes en el sitio de unión de la colchicina entre el ligando cristalizado CA-4 y las moléculas **10–12** con el blanco α/β -tubulina con los programas AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	Programa (Puntuación)	Interacciones
CA4	AutoDock 4.2 (-8.42 kcal/mol)	Hidrofóbicas: β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, β Ile 378, α Val 181, β Met 259 y β Lys 352. Enlace hidrógeno: α Thr 179 y β Lys 352
	GOLD (70.94)	Hidrofóbicas: β Val 238, β Leu 242, β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, β Lys 352, α Ala 180, α Val 181 y β Met 259. Enlace hidrógeno: α Val 181
10	AutoDock 4.2 (-8.38 kcal/mol)	Hidrofóbicas: β Leu 242, β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, β Ile 378 y β Lys 352. Enlace hidrógeno: β Lys 352
	GOLD (78.54)	Hidrofóbicas: β Leu 248, β Ala 250, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, β Lys 352 y β Met 259
11	AutoDock 4.2 (-8.38 kcal/mol)	Hidrofóbicas: β Leu 242, β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Met 259 y β Lys 352. Enlace hidrógeno: β Ala 317, β Lys 352 y β Asn 258
	GOLD (71.50)	Hidrofóbicas: β Val 238, β Leu 242, β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, β Lys 352 y β Met 259. Enlace hidrógeno: β Val 315 y β Lys 352
12	AutoDock 4.2 (-8.47 kcal/mol)	Hidrofóbicas: β Leu 242, β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Ile 318, β Ala 354, β Ile 378 y β Lys 352. Enlace hidrógeno: β Lys 352
	GOLD (80.33)	Hidrofóbicas: β Leu 248, β Ala 250, β Leu 255, β Ala 316, β Asn 258, β Lys 352, α Thr 179, α Val 181 y β Met 259. Enlace hidrógeno: β Asn 349, β Ala 317 y α Thr 179

Los resultados indican que las moléculas **10–12** tienen una afinidad similar al del ligando cristalizado CA-4 por el sitio de colchicina de la α/β -tubulina, ya que las tres moléculas en los tres programas presentan la mayoría de interacciones hidrofóbicas que forman el bolsillo estabilizador que Gaspari reportó para el ligando cristalizado CA-4 en 2017, además, presentan enlaces de hidrógeno que pudiesen proporcionar una mayor estabilidad al complejo ligando-blanco terapéutico (Gaspari R., 2017).

Estos resultados sugieren que las moléculas **10–12** pudieran presentar una alta afinidad sobre el sitio de colchicina en α/β -tubulina, y, por lo tanto, pudiesen presentar una actividad biológica similar, o incluso, mejor que la combretastatina A-4.

En el análisis de los resultados se determinó la importancia de las características farmacofóricas presentes en la CA-4, se determinó que los anillos aromáticos participan de manera importante en la estabilización de los ligandos, esto se debe a que los residuos hidrofóbicos presentes en este sitio de unión permiten interacciones de apilación entre los anillos y los residuos, además de que residuos alifáticos participan con interacciones Pi-alquilo, Pi-sigma o Pi-sulfuro para estabilizar estos anillos; los grupos metoxilo son importantes para ejercer interacciones hidrofóbicas con los residuos presentes en el bolsillo estabilizador, además de los enlaces de hidrógeno que propician una mayor estabilidad del complejo dados por las interacciones entre los grupo OH o carbonilo de las moléculas evaluadas, como se mostró, la incorporación del carboxilato en las moléculas permitió la generación de interacciones por puentes de hidrógeno. La afinidad encontrada en estos complejos puede deberse a que durante el diseño racional se pretendió obtener potenciales bioisómeros que presentaran una estequiometría y un número de donadores y aceptores de hidrógeno parecido a la molécula cabeza de serie, la combretastatina A-4, lo que permite obtener afinidad parecida al fármaco líder.

8.4.2. Acoplamiento molecular con AKR1C3

Para el acoplamiento molecular entre las moléculas **1–15** y la AKR1C3 se seleccionó el sitio activo reportado para ejercer un efecto inhibitorio en esta macromolécula (Flanagan J., 2012). En la Tabla 12 se muestran los resultados del acoplamiento molecular entre el ligando cristalizado, el ligando creado y las moléculas **1–15** con la AKR1C3, además de mostrar el RMSD obtenido de la validación del método.

Tabla 12. Puntuación del acoplamiento molecular del ligando cristalizado (Ibup), ligando creado (Ibuprofeno) y las moléculas 1–15 con el blanco AKR1C3 utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	AutoDock Vina (ΔG kcal/mol)	AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol)	GOLD (chemplp score)
Ibup	-7.8	-6.77	62.04
Ibuprofeno	-7.9	-6.54	61.58
RMSD (Ibup con Ibuprofeno)	1.309	0.922	0.455
1	-10.2	-7.97	75.30
2	-9.6	-8.71	75.81
3	-9.4	-7.87	74.59
4	-8.0	-6.99	58.01
5	-8.1	-5.55	69.85
6	-8.4	-5.99	64.08
7	-8.5	-6.90	70.84
8	-8.1	-6.98	75.83
9	-8.5	-6.14	72.47
10	-9.3	-7.87	75.22
11	-8.8	-8.43	84.15
12	-9.3	-7.96	79.94
13	-9.7	-8.36	68.49
14	-7.8	-8.20	84.48
15	-8.4	-7.86	73.42

Los resultados obtenidos indican que el docking score obtenido en AutoDock Vina por parte del ligando cristalizado es de -7.8 kcal/mol y la energía de unión del ligando creado es de -7.9 kcal/mol, además de obtener un RMSD de 1.309. Esta información permite determinar la validación del método, ya que, el ligando creado obtuvo un modo y un docking score similar a la del ligando cristalizado, sumándole el valor de RMSD obtenido, que cae dentro de los valores aceptados para indicar la validación del procedimiento. La validación del método utilizando AutoDock 4.2 indicó resultados similares, el docking score del ligando cristalizado fue de -6.77 kcal/mol y la del ligando creado de -6.54 kcal/mol, el RMSD obtenido fue 0.922, por lo tanto, los valores obtenidos en este programa indican una validación correcta del método. En el caso de GOLD, el *chemplp score* del ligando cristalizado fue 62.04, mientras que el ligando creado obtuvo un *chemplp score* de 61.58 y un RMSD de 0.455, estos valores indican, que al igual que con los otros programas, la validación del método se llevó a cabo de manera adecuada.

En AKR1C3, todas las moléculas presentan una puntuación mayor en comparación con la puntuación obtenida del ligando cristalizado, sin embargo, las series de moléculas que obtuvieron mejores puntuaciones son los derivados de celecoxib **1–3** y los derivados de ibuprofeno **10–12**.

Para la selección de moléculas a evaluar con respecto a sus interacciones, se consideraron dos factores: el primero de ellos es que durante la investigación se encontró que el derivado de celecoxib **2** ya había sido sintetizado y evaluado con respecto a su citotoxicidad, que, a largo plazo, es el objetivo de las moléculas presentadas (Nguyen H., 2019). El otro factor es que los derivados de ibuprofeno **10–12** obtuvieron mejores valores en la evaluación con α/β tubulina, siendo este blanco terapéutico el de mayor interés, ya que está relacionado directamente con una actividad citotóxica, mientras que la AKR1C3 no se relaciona directamente con citotoxicidad, esta enzima solamente se sobreexpresa en tumores dependientes de hormonas (Flanagan J., 2012).

Para hacer el análisis de las interacciones presentes entre las moléculas **10–12** y el blanco AKR1C3, se identificaron las interacciones reportadas con el ligando cristalizado de referencia Ibuf. Las interacciones presentes del ligando cristalizado Ibuf se resumen en la Tabla 13. Según Flanagan, el acomodo de los ligandos en el sitio activo de esta enzima se puede dar de 3 maneras: unión en los bolsillos hidrofóbicos SP1, SP2 y/o SP3; sin embargo, la unión a cualquiera de estos 3 bolsillos permite la inhibición de la actividad biológica de la macromolécula, esto debido a que justo en este bolsillo es donde se llevan a cabo las reacciones catalíticas de esta enzima. Los inhibidores de AKR1C3 estructuralmente caracterizados se unen al sitio de oxianión directamente o adyacente a este sitio, bloqueando eficazmente la unión productiva de las moléculas de sustrato. Por lo tanto, moléculas con características hidrofóbicas pudiesen interactuar y ser estabilizadas dentro de alguno de los bolsillos, además, el enlace de hidrógeno con el oxianión, aparte de inhibir competitivamente a la enzima, aporta una mayor estabilidad al complejo ligando-blanco molecular (Flanagan J., 2012).

Tabla 13. Interacciones reportadas en los bolsillos hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibup (Flanagan J., 2012)

Residuo	Tipo de interacción	Residuo	Tipo de interacción
ASN 167 (SP1)	Hidrofóbica	TRP 227 (SP2)	Hidrofóbica
PHE 306 (SP1) (SP3)	Hidrofóbica	TYR 24 (SP3)	Hidrofóbica
PHE 311 (SP1) (SP2)	Hidrofóbica	TYR 55 (OX)	Enlace de hidrógeno
TYR 319 (SP1)	Hidrofóbica	HIS 117 (OX)	Enlace de hidrógeno
TRP 86 (SP2)	Hidrofóbica		

Según Flanagan, las interacciones hidrofóbicas más relevantes involucradas en la estabilización de los ligandos son: Phe 306, Phe 311, Trp 227, mientras que el enlace de hidrógeno en el sitio del oxianión con los residuos Tyr 55 e His 117 permite la inhibición de la macromolécula.

Las interacciones que se obtuvieron entre el ligando cristalizado Ibup, utilizando el programa AutoDock Vina, se pueden observar en la Imagen 17. Los resultados indican que cuatro interacciones son de características hidrofóbicas y una de enlace de hidrógeno. Las Interacciones hidrofóbicas encontradas son: Phe 306, Phe 311, Tyr 319 y Trp 227; el anillo aromático del ibuprofeno es estabilizado por el residuo Phe 311 por medio de una apilación Pi-Pi; por otro lado, el grupo 4-(2-metilpropilo) del ibuprofeno presenta interacciones con Phe 311 del tipo Pi-sigma, y con el residuo Tyr 319 del tipo Pi-alquilo; el sustituyente isobutirato interactúa con los residuos Trp 227 y Phe 306 de manera alquilo-alquilo, esto indica que el modo de unión es preferentemente en el bolsillo SP1. Por último, se encontró un enlace de hidrógeno por parte del oxígeno del carboxilato con el grupo amino del imidazol

presente en His117, indicando la unión con el sitio del oxianión responsable de la inhibición de la enzima. Este análisis permite determinar que el modo de unión del ligando de referencia Ibut identificado por acoplamiento molecular es similar al identificado con el ligando cristalizado por Flanagan (Flanagan J., 2012).

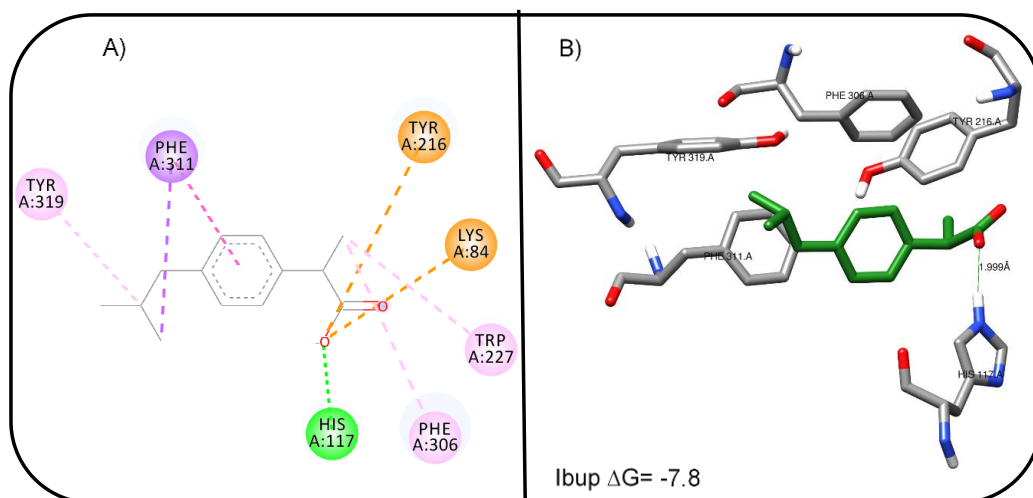


Imagen 17. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibut en 2D, y B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibut en 3D.

Las interacciones encontradas en el acoplamiento molecular entre la molécula **10** y la AKR1C3 ($\Delta G = -9.3$ kcal/mol) se pueden observar en la Imagen 18. Este compuesto comparte interacciones con el ligando cristalizado, obteniendo cuatro interacciones hidrofóbicas y un enlace de hidrógeno. Las interacciones hidrofóbicas son: Phe 306, Phe 311, Trp 227 y Tyr 24, esto indica que el modo de unión de esta molécula tiene preferencia por los bolsillos SP2 y 3; en este acoplamiento se encontró un enlace de hidrógeno con Tyr 55. La estabilización de los anillos de la molécula **10** se efectúa por apilamiento Pi-Pi con los residuos aromáticos Tyr 216, Phe 306 e His 117; el sustituyente alifático interacciona con Tyr 24 de manera Pi-sigma, mientras que, el sustituyente isobutirato presenta interacciones hidrofóbicas con Phe 306 y Phe 311, además, el grupo NH presente en la molécula interacciona con el sitio oxianión con el hidroxilo de Tyr 55, indicando un posible efecto inhibitorio (Imagen 18 A y C). En la Imagen 18 C se puede mostrar una interacción donador-

donador desfavorable entre el grupo NH de esta molécula y la His 117, sin embargo, a pesar de tener esta interacción desfavorable, la molécula **10** obtuvo una energía de unión favorable, por lo que, esto podría indicar que aunque exista esta interacción desfavorable, el ligando podría unirse efectivamente en la AKR1C3, este complejo podría ser evaluado en una dinámica molecular para determinar si la dinámica de unión permite un acomodo estructural diferente, evitando así esta interacción (Hollingsworth S., 2018). Tanto las interacciones hidrofóbicas como los enlaces de hidrógeno indican que el modo de unión de la molécula **10** es semejante al encontrado con el ligando cristalizado Ibup, esto es mostrado en la Imagen 18 B y D.

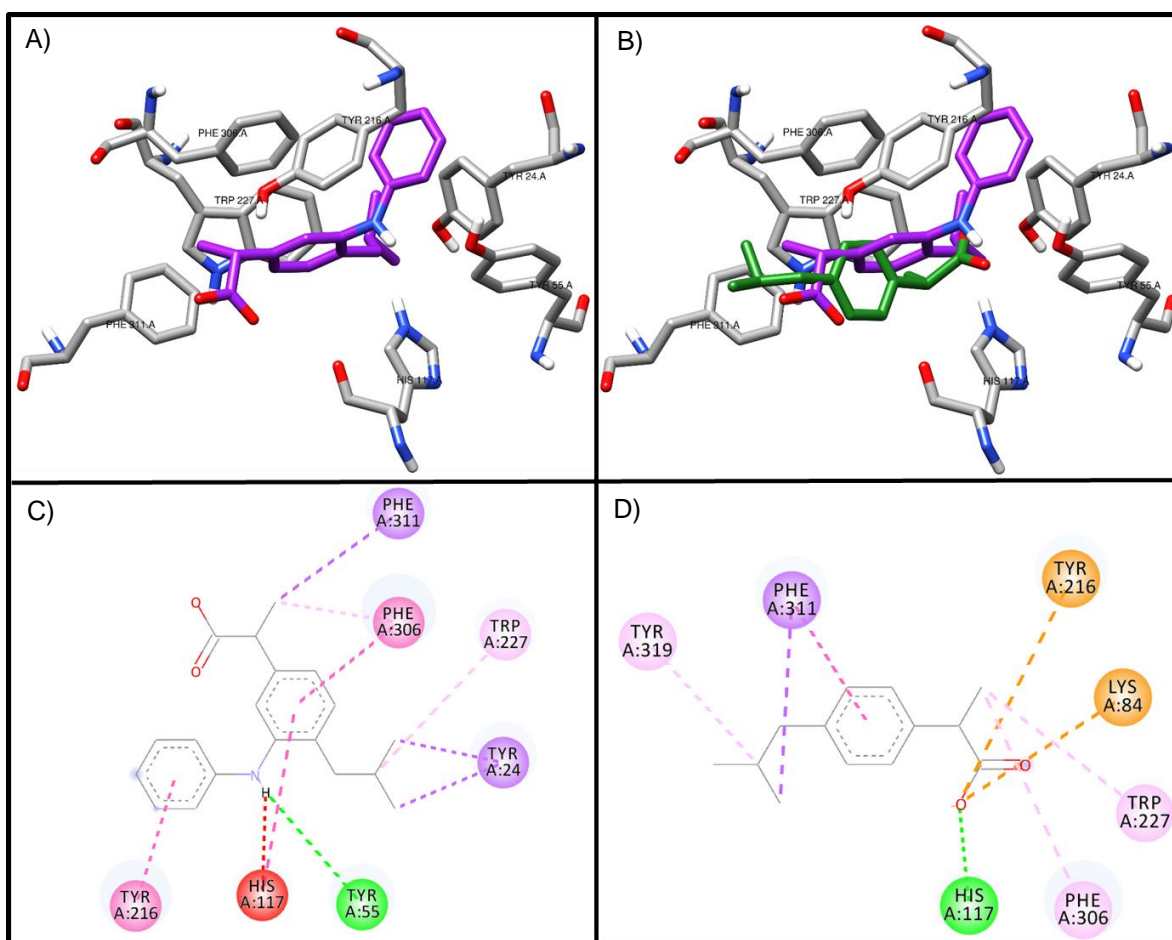


Imagen 18. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **10** (morado) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **10**

(morado) en presencia del ligando cristalizado Ibup (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **10** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibup en 2D.

La molécula **11** ($\Delta G = -8.8$ kcal/mol) presenta interacciones con el blanco AKR1C3 detalladas en la Imagen 19. Al igual que la molécula **10**, el compuesto **11** comparte interacciones con el ligando cristalizado. Presenta cuatro interacciones hidrofóbicas reportadas y un enlace de hidrógeno. Las interacciones hidrofóbicas las forma con los residuos: Phe 306, Phe 311, Trp 227 y Tyr 24, estas interacciones indican que esta molécula tiene preferencia de unión en los sitios SP2 y 3 (Flanagan J., 2012). La estabilización de los anillos se da por apilamiento Pi-Pi con los anillos aromáticos de Tyr 55, Tyr 216 y Phe 306, mientras que la cadena alifática presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos Trp 227 y Leu 54, los sustituyentes trimetoxilo interaccionan de manera hidrofóbica con los residuos Tyr 24, Leu 268, Ser 166, Lys 84 e His 117, se encontró un enlace de hidrógeno por parte de un oxígeno de un metoxilo con el grupo hidroxilo del residuo Tyr 55; el isobutirato interacciona con Phe 311 y Met 120 de manera hidrofóbica, además, se encontró un enlace de hidrógeno con el residuo Tyr 216 que no ha sido reportado (Imagen 19 A y C). Estas interacciones sugieren que el modo de unión de la molécula **11** es semejante al modo de unión del ligando cristalizado Ibup, aunque esta molécula tiene preferencia por los bolsillos SP2 y 3, esto se muestra en la Imagen 19 B y D.

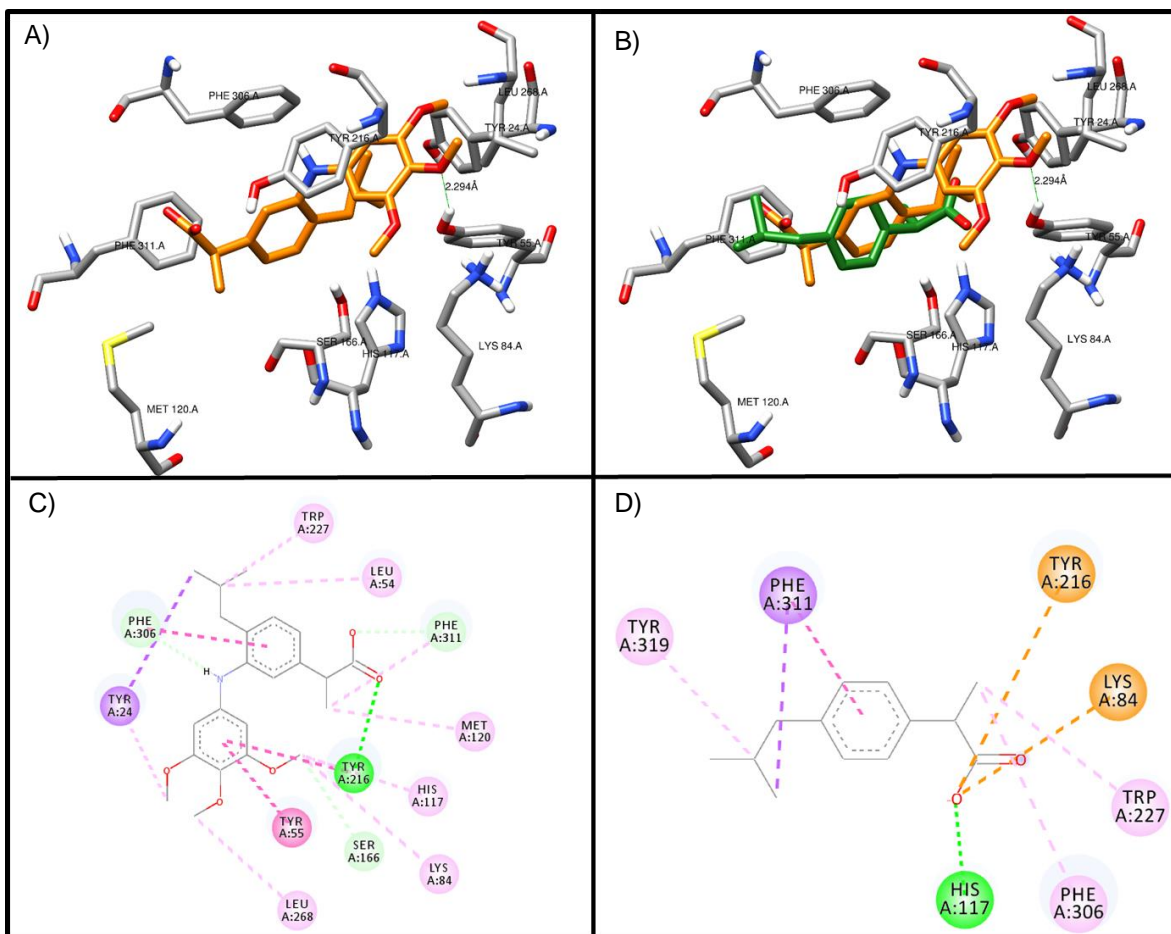


Imagen 19. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **11** (naranja) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **11** (naranja) en presencia del ligando cristalizado Ibup (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **11** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibup en 2D.

La Imagen 20 muestra las interacciones obtenidas del acoplamiento molecular entre la molécula **12** y el blanco molecular AKR1C3. Este compuesto presenta cinco interacciones hidrofóbicas reportadas y un enlace de hidrógeno. Las interacciones hidrofóbicas presentes son Phe 306, Phe 311, Trp 227, Tyr 319 y Tyr 24, estas interacciones indican que la molécula **12**, al igual que el ligando cristalizado Ibup, tiene preferencia por el bolsillo SP1; los residuos Tyr 24, Phe 306 y Phe 311 estabilizan los anillos de la molécula por medio de apilaciones Pi-Pi, el grupo

metoxilo interacciona con Phe 311 y Tyr 319 de manera Pi-alquilo, mientras que la cadena alifática interacciona de manera hidrofóbica con los residuos Trp 227 y Leu 54; el grupo isobutirato interacciona de manera hidrofóbica con los residuos Tyr 216 y Phe 306, mientras que el oxígeno del carbonilo presenta un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo del residuo Tyr 55 (Imagen 20 A y C). Estas interacciones, al igual que las moléculas **10** y **11**, sugieren un modo de unión parecido al del ligando cristalizado Ibut, y, como consecuencia, una posible inhibición a esta enzima, esto es mostrado en la Imagen 20 B y D (Flanagan J., 2012).

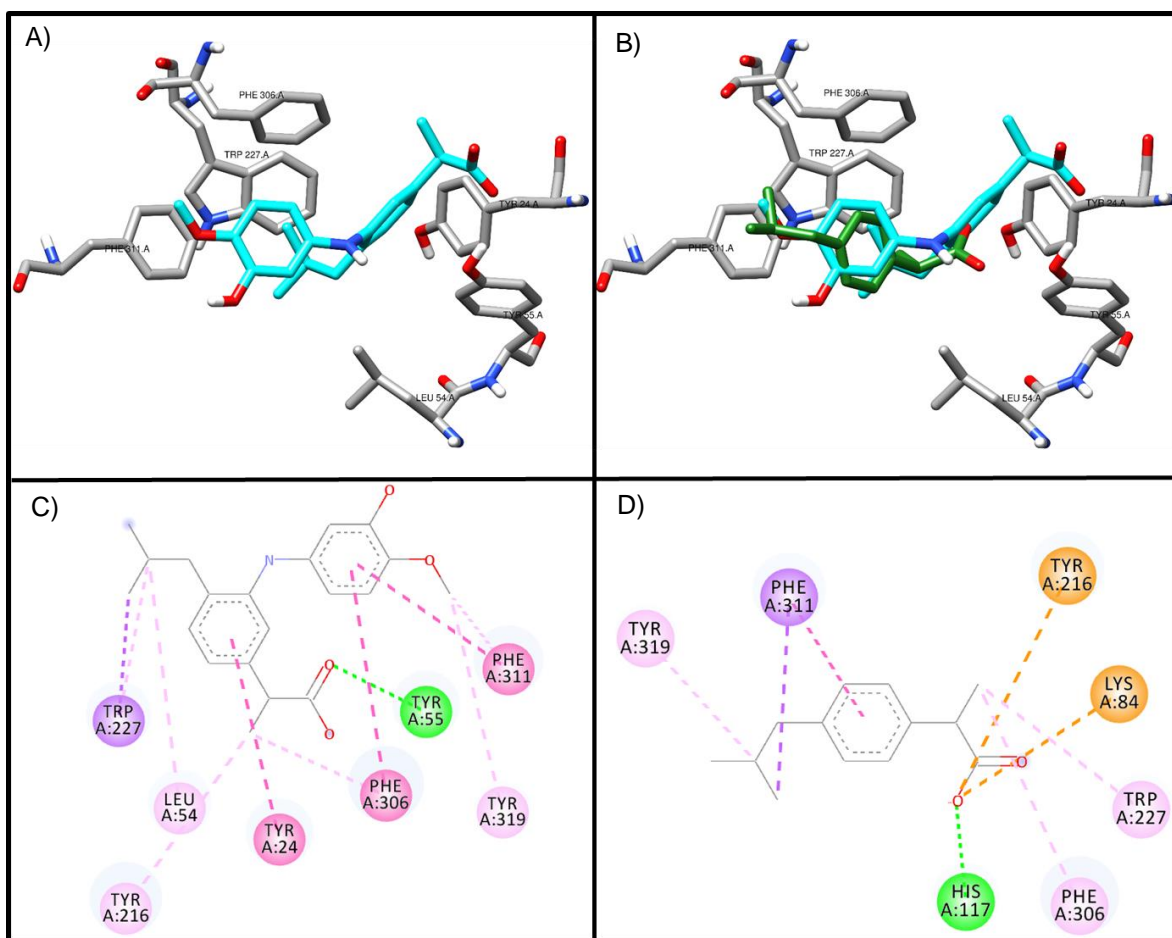


Imagen 20. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **12** (cian) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **12** (cian) en presencia del ligando cristalizado Ibut (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y la molécula **12** en

2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular AKR1C3 y el ligando cristalizado Ibup en 2D.

En la Tabla 14 se muestra el análisis de las interacciones presentes entre las moléculas **10–12** y el ligando cristalizado Ibup con el blanco AKR1C3 utilizando los programas AutoDock 4.2 y GOLD.

Tabla 14. Interacciones presentes entre el ligando cristalizado Ibup, las moléculas **10–12** y el blanco AKR1C3 con los programas AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	Programa (Puntuación)	Interacciones
Ibup	AutoDock 4.2 (-6.77 kcal/mol)	SP1: Asn 167, Phe 306, Phe 311, Tyr 319. SP2: Phe 311. SP3: Phe 306. OX: His 117
	GOLD (62.04)	SP1: Asn 167, Phe 306, Phe 311, Tyr 319. SP2: Phe 311, Trp 227. SP3: Phe 306. OX: His 117, TYR 55
10	AutoDock 4.2 (-7.87 kcal/mol)	SP1: Phe 306, Phe 311, Tyr 319. SP2: Phe 311. SP3: Phe 306. OX: His 117
	GOLD (75.22)	SP1: Phe 311. SP2: Phe 311, Trp 86, Trp 227. OX: His 117
11	AutoDock 4.2 (-8.43 kcal/mol)	SP1: Phe 306, Phe 311, Tyr 319. SP2: Phe 311, Trp 86, Trp 227. SP3: Phe 306, Tyr 24, Gln 222. OX: His 117, Tyr 55
	GOLD (84.15)	SP1: Asn 167, Phe 306, Phe 311, Tyr 319. SP2: Phe 311. SP3: Phe 306. OX: Asn 167, Tyr 216, Tyr 319 (no reportados)
12	AutoDock 4.2 (-7.96 kcal/mol)	SP1: Phe 306, Phe 311, Tyr 319. SP2: Phe 311, Trp 227. SP3: Phe 306. OX: His 117
	GOLD (79.94)	SP1: Asn 167, Phe 306, Phe 311, Tyr 319. SP2: Phe 311, Trp 227. SP3: Phe 306, Tyr 24. OX: Tyr 55

Los resultados indican que las moléculas **10–12** tienen un modo de unión en la AKR1C3 similar al del ligando cristalizado Ibup, ya que las tres moléculas en los tres programas presentan la mayoría de las interacciones hidrofóbicas que Flanagan

reportó para el ligando cristalizado Ibuf y otras moléculas en 2017. Sin embargo, debido a las interacciones encontradas en AutoDock 4.2 y GOLD, no se permite determinar una afinidad hacia un bolsillo en específico por parte de las moléculas **10** y **11**; contrario a esto, la molécula **12** presentó una afinidad por el bolsillo SP1 en los tres programas. Como ya se mencionó, se reporta que la unión en cualquiera de los tres bolsillos, sumada a un enlace de hidrógeno en el oxianión, permite la inhibición de la actividad biológica por parte de la AKR1C3. De la misma manera, las tres moléculas presentan enlaces de hidrógeno que pudiesen provocar la inhibición de esta enzima, además de proporcionar una mayor estabilidad al complejo ligando-blanco terapéutico (Flanagan J., 2012). Estos resultados sugieren que las moléculas **10–12** pudieran presentar una afinidad, y, por lo tanto, una inhibición de la actividad de AKR1C3.

8.4.3. Acoplamiento molecular con COX-1

Para el acoplamiento molecular entre las moléculas **1–15** y la COX-1 se seleccionó el sitio activo reportado para ejercer un efecto inhibitorio en esta macromolécula (Rimon G., 2010). En la Tabla 15 se muestran los resultados del acoplamiento molecular entre el ligando cristalizado, el ligando creado y las moléculas **1–15** con la COX-1, además de mostrar el RMSD obtenido de la validación del método.

Tabla 15. Puntuación del acoplamiento molecular del ligando cristalizado (Celecoxib), ligando creado (Celecoxib1) y las moléculas **1–15** con el blanco COX-1 utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	AutoDock Vina (ΔG kcal/mol)	AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol)	GOLD (chemplp score)
Celecoxib	-10.0	-11.16	88.27
Celecoxib1	-10.1	-10.59	79.50
RMSD (Celecoxib con Celecoxib1)	0.981	0.877	1.243
1	-9.6	-9.95	79.77
2	-8.7	-10.53	64.09
3	-9.5	-10.13	82.53
4	-7.9	-6.73	59.06
5	-6.9	-7.15	61.42
6	-7.4	-7.41	61.24
7	-7.6	-6.46	65.33
8	-7.4	-6.53	61.77
9	-7.7	-7.13	66.33
10	-8.7	-8.24	70.06
11	-6.9	-7.28	71.01
12	-8.3	-8.68	65.45
13	-7.1	-8.63	75.19
14	-7.1	-7.3	50.08
15	-6.8	-7.0	68.11

Los resultados obtenidos en AutoDock Vina muestran que la energía de unión del ligando cristalizado (Celecoxib) y del ligando creado (Celecoxib1) es -10.0 kcal/mol y -10.1 kcal/mol respectivamente, además de obtener un RMSD de 0.981, esto indica que, en este programa, la validación del método se llevó a cabo de manera adecuada. De la misma forma, en los programas AutoDock 4.2 y GOLD se encontraron puntuaciones similares entre el ligando cristalizado y el ligando creado, además de obtener un RMSD menor a 2, por lo que, se puede determinar una correcta validación del método.

En COX-1, todas las moléculas presentan una puntuación menor en comparación con la puntuación del ligando cristalizado. Sin embargo, las series de moléculas que obtuvieron mejores puntuaciones son los derivados de celecoxib **1–3** y los derivados de ibuprofeno **10–12**. Al igual que en el caso de la AKR1C3, la selección de moléculas consideró los dos factores ya mencionados, por lo que se tomó la

decisión de realizar el análisis de interacciones con los derivados de ibuprofeno **10–12**.

Para determinar las interacciones presentes entre las moléculas **10–12** y la COX-1 se identificaron las interacciones reportadas con el ligando cristalizado, además de las interacciones reportadas para otros AINEs. Las interacciones encontradas se presentan en la Tabla 16. Diversos autores plantean que el sitio de inhibición de la COX-1 está conservado, incluye residuos hidrofóbicos que forman un bolsillo de estabilidad y enlaces de hidrógeno con residuos que permiten la inhibición de la actividad de esta enzima, como el residuo Tyr 355 y Arg 120 (Kishore P., 2017; Selinsky B., 2001).

Tabla 16. Interacciones reportadas en los bolsillos hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno entre el blanco molecular COX-1 y AINEs (Kishore P., 2017; Rimon G., 2010; Selinsky B., 2001)

Residuo	Tipo de interacción	Residuo	Tipo de interacción
ILE 523	Hidrofóbica	ILE 517	Hidrofóbica
GLN 192	Hidrofóbica	ALA 527	Hidrofóbica
LEU 352	Hidrofóbica	GLY 526	Hidrofóbica
PHE 518	Hidrofóbica	VAL 349	Hidrofóbica
TYR 385	Hidrofóbica	LEU 531	Hidrofóbica
TYR 355	Hidrofóbica	GLU 524	Enlace de hidrógeno
HIS 90	Hidrofóbica	ARG 120	Enlace de hidrógeno

Los autores plantean que las interacciones hidrofóbicas más relevantes son con Ile 523, Leu 352, Tyr 385, Phe 518 y Gly 526, mientras que los enlaces de hidrógeno más representativos se forman con Glu 524 y Arg 120. Las interacciones que se obtuvieron entre el ligando cristalizado Celecoxib, utilizando el programa AutoDock Vina, se pueden observar en la Imagen 21 (Kishore P., 2017; Rimon G., 2010; Selinsky B., 2001).

Como se muestra en la Imagen 21, nueve interacciones hidrofóbicas reportadas se encuentran entre el ligando cristalizado Celecoxib y la COX-1. Las interacciones reportadas se presentan con los residuos: Ile 523, Phe 518, Leu 352, Tyr 355, His 90, Ala 527, Gly 526 y Val 349; los anillos aromáticos son estabilizados por Tyr 355 por medio de apilamiento Pi-Pi, por Ala 527, Ile 523 y Leu 352 por interacciones Pi-sigma, y por Val 349, Ala 527 y Leu 352 por medio de interacciones Pi-alquilo. Los grupos alifáticos presentes en el ligando cristalizado interactúan con residuos hidrofóbicos por medio de interacciones alquilo-alquilo, por último, el Celecoxib forma enlaces de hidrógeno con: Leu 352, Ile 517, Phe 518, Ser 516 y Ser 353, estas interacciones se dan entre la sulfonamida y estos residuos, cabe mencionar que estos enlaces de hidrógeno solamente están reportados por el autor que realizó la cristalización de este complejo, otros autores estudiaron otros AINEs y no reportan estos enlaces. Como se observa, el ligando cristalizado presenta afinidad por el sitio activo de COX-1, ya que presenta las interacciones hidrofóbicas reportadas para permitir la estabilización de los ligandos en el bolsillo hidrofóbico, esto indica que el modo de unión del ligando de referencia celecoxib identificado por acoplamiento molecular es similar al identificado con el ligando cristalizado por Rimón (Rimón G., 2010; Selinsky B., 2001).

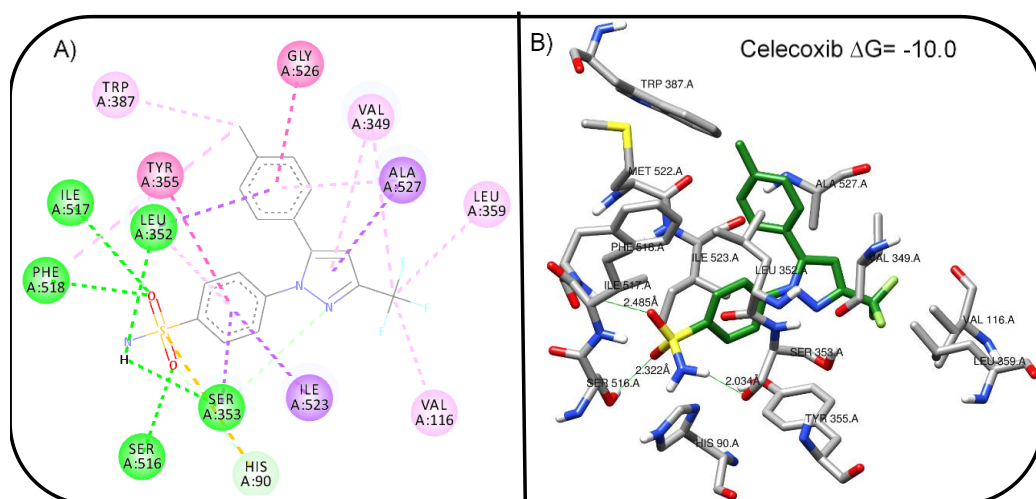


Imagen 21. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y el ligando cristalizado Celecoxib en 2D, y B) Interacciones obtenidas del

acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y el ligando cristalizado Celecoxib en 3D.

Las interacciones encontradas en el acoplamiento molecular entre la molécula **10** y la COX-1 ($\Delta G = -8.3$ kcal/mol) se pueden observar en la Imagen 22. Este compuesto comparte interacciones con el ligando cristalizado, además de presentar interacciones reportadas. Se observan seis interacciones hidrofóbicas: Ile 523, Tyr 355, Leu 352, Ala 527, Val 349 y Leu 531; en este acoplamiento se encontró un enlace de hidrógeno con Arg 120, el cual ya se encuentra reportado por diversos autores (Imagen 22 A y C) (Selinsky B., 2001). La estabilización de los anillos de la molécula **10** se efectúa por apilamiento Pi-Pi con el residuo Tyr 355, por interacciones Pi-sigma con Ile 523, Val 349 y Ala 527, y por interacciones Pi-alquilo con Leu 352 y Leu 531; el metilo del grupo isobutirato interacciona con residuos hidrofóbicos presentes en el bolsillo, y, por último, el enlace de hidrógeno se da entre el oxígeno del carbonilo y un grupo amino de Arg 120. Estas interacciones coinciden con las reportadas por diversos autores, esto indica que la molécula **10** presenta un modo de unión similar al del ligando cristalizado, por lo que, podría ejercer un efecto inhibitorio en el sitio activo de la COX-1 (Imagen 22 B y D) (Kishore P., 2017; Rimon G., 2010).

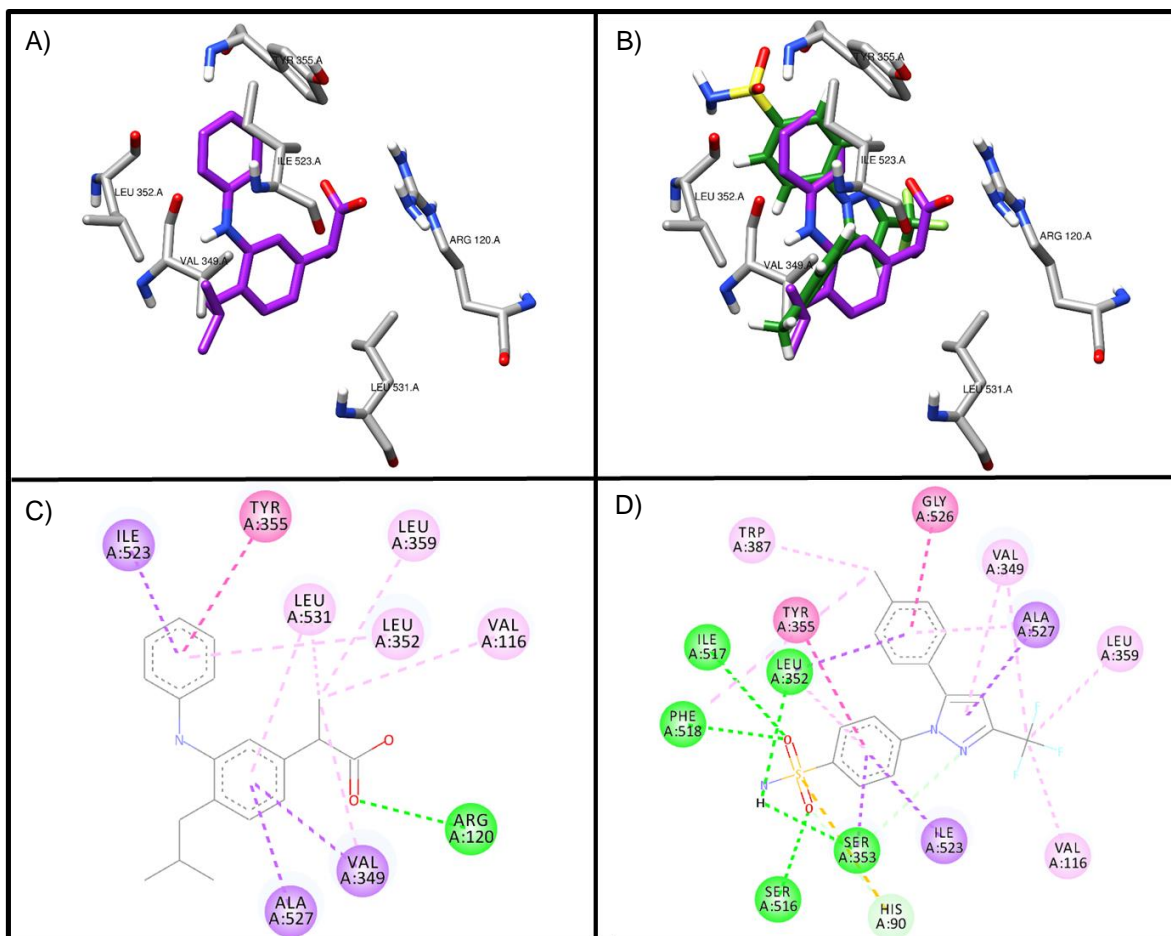


Imagen 22. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **10** (morado) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **10** (morado) en presencia del ligando cristalizado Celecoxib (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **10** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y el ligando cristalizado celecoxib en 2D.

La molécula **11** ($\Delta G = -6.9$ kcal/mol) presenta interacciones con el blanco COX-1 detalladas en la Imagen 23. A diferencia de la molécula **10**, el compuesto **11** comparte muy pocas interacciones con el ligando cristalizado. Solamente presenta dos interacciones hidrofóbicas reportadas y cuatro enlaces de hidrógeno no reportados. La única interacción hidrofóbica reportada se presenta con His 90; este acoplamiento no muestra interacciones que se relacionen con la estabilización de los anillos de la molécula, esto también podría justificar la energía de unión que se

obtuvo, la cual no es tan buena, en comparación con las demás moléculas o el ligando cristalizado (Imagen 23 A y C). Como se puede observar en la Imagen 23 B y D, este acoplamiento permite determinar que el modo de unión de esta molécula no es tan similar al modo de unión del ligando cristalizado, aunque hay unión, esta molécula no presenta la mayoría de las interacciones ya reportadas para ejercer un efecto inhibitorio en COX-1, sin embargo, como se muestra más adelante, el acoplamiento con AutoDock 4.2 y GOLD difiere del acoplamiento realizado con AutoDock Vina, por lo que, el acoplamiento con AutoDock Vina no es determinante para concluir que la molécula **11** no tiene afinidad por el sitio activo de COX-1.

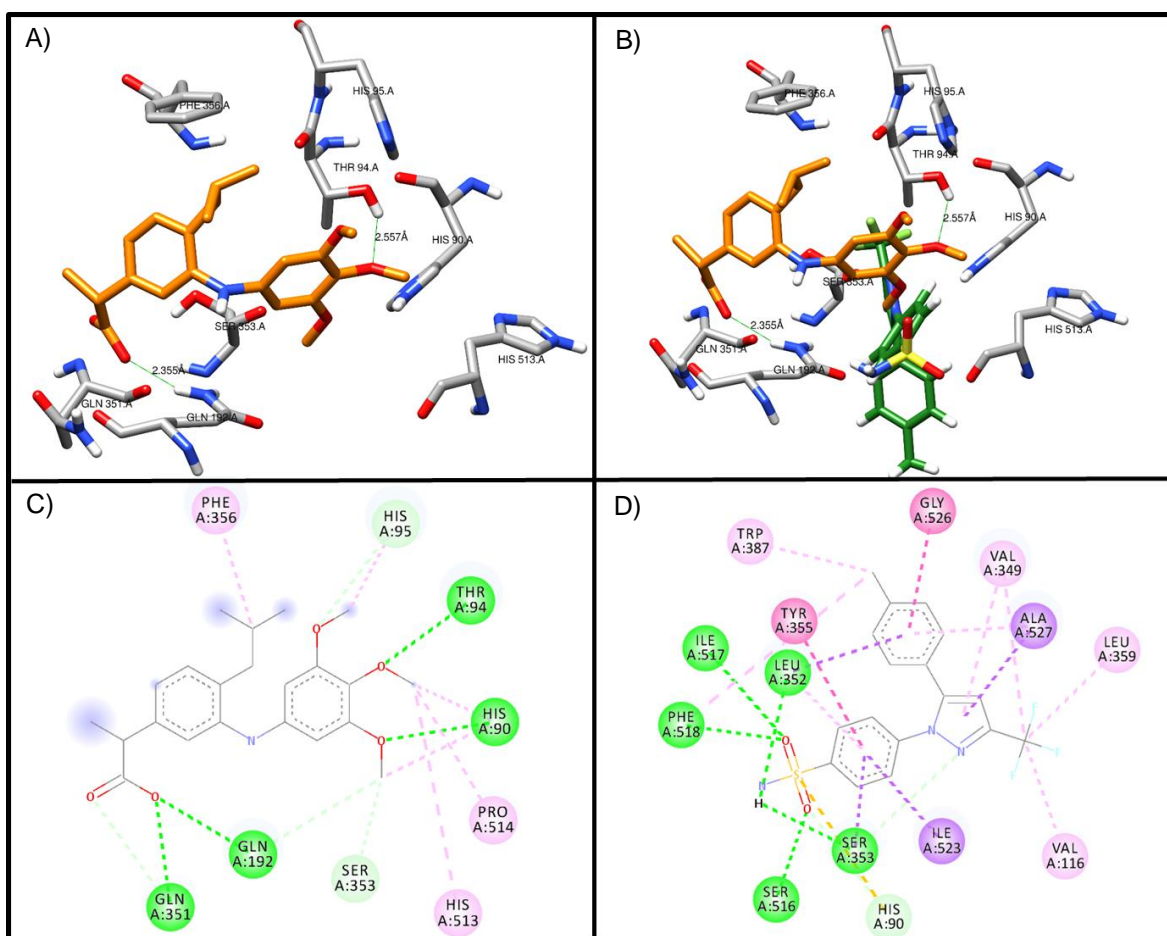


Imagen 23. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **11** (naranja) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **11** (naranja) en presencia del ligando cristalizado celecoxib (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **11** en

2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y el ligando cristalizado celecoxib en 2D.

La Imagen 24 muestra las interacciones obtenidas del acoplamiento molecular entre la molécula **12** y el blanco molecular COX-1 ($\Delta G = -8.3$ kcal/mol). Este compuesto presenta ocho interacciones hidrofóbicas reportadas y un enlace de hidrógeno no reportado. Las interacciones hidrofóbicas reportadas presentes son: Ile 523, Tyr 355, Gln 192, Leu 352, His 90, Ala 527, Val 349 y Leu 531, el enlace de hidrógeno no reportado se da con Ser 353 (Imagen 24 A y C). Los anillos aromáticos de la molécula **12** son estabilizados por apilamiento Pi-Pi con Tyr 355, por interacciones Pi-sigma con Ile 523, Val 349 y Ala 527, además de formar interacciones Pi-alquilo con Leu 531 y Leu 352; los grupos alifáticos interaccionan con residuos alifáticos por interacciones alquilo-alquilo, el grupo metoxilo de la molécula interacciona con His 90 por interacción tipo alquilo-alquilo y con Gln 192 de manera hidrofóbica, mientras que el enlace de hidrógeno no reportado se forma con el grupo hidroxilo de la molécula y Ser 353. Al igual que la molécula **10**, la molécula **12** comparte interacciones con el ligando cristalizado celecoxib (Imagen 24 B y D) y presenta interacciones reportadas para otros AINEs, por lo que, se puede determinar que esta molécula podría presentar una buena afinidad por el sitio activo de COX-1, y, por lo tanto, ejercer un efecto inhibitorio sobre este blanco molecular (Selinsky B., 2001).

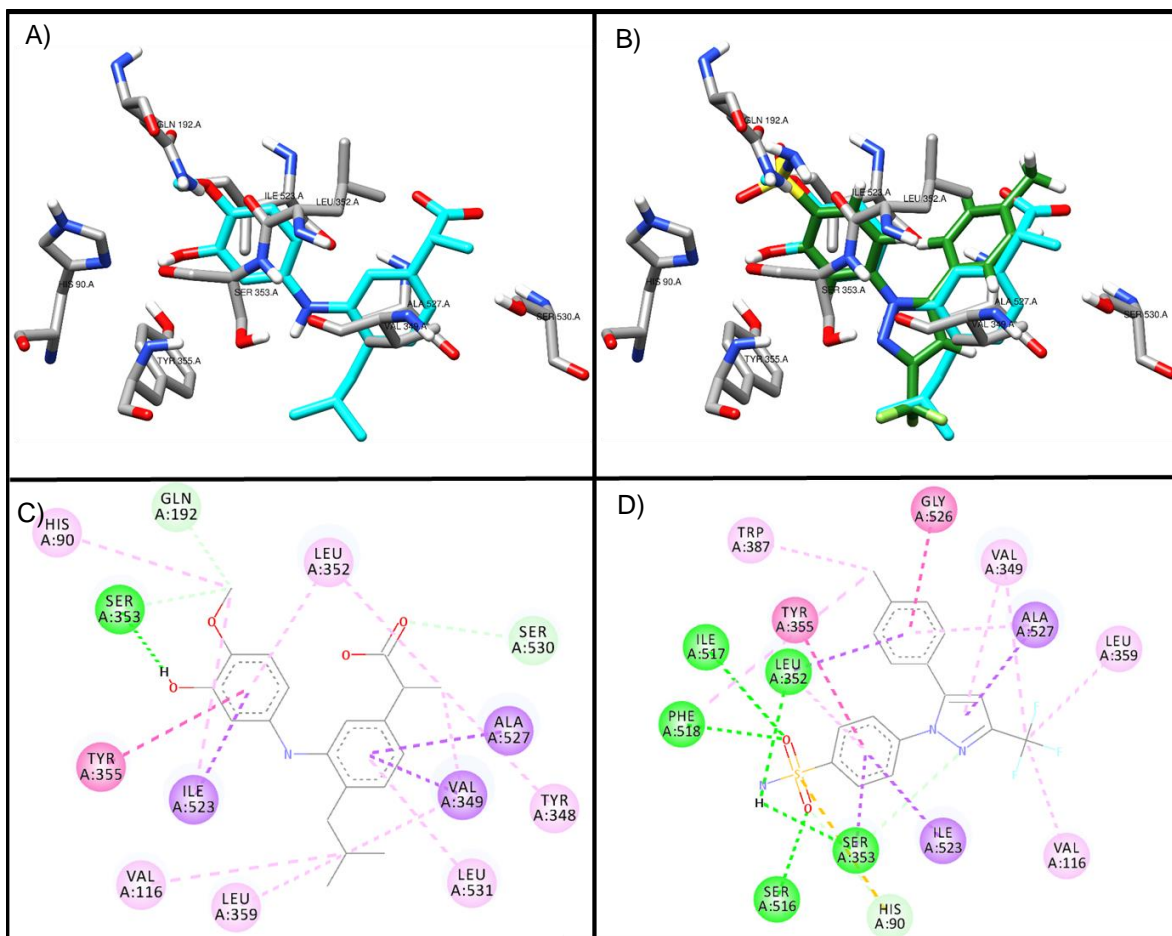


Imagen 24. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **12** (cian) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **12** (cian) en presencia del ligando cristalizado celecoxib (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y la molécula **12** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-1 y el ligando cristalizado celecoxib en 2D.

En la Tabla 17 se muestra el análisis de las interacciones presentes entre las moléculas **10–12** y el ligando cristalizado celecoxib con el blanco COX-1 utilizando los programas AutoDock 4.2 y GOLD.

Tabla 17. Interacciones presentes entre el ligando cristalizado Celecoxib, las moléculas **10-12** y el blanco COX-1 con los programas AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	Programa (Puntuación)	Interacciones
Celecoxib	AutoDock 4.2 (-11.16 kcal/mol)	Ile 523, Tyr 355, Leu 352, Phe 518, His 90, Ala 527, Val 349 y Leu 531
	GOLD (88.27)	Ile 523, Leu 352, Phe 518, His 90, Ala 527, Gly 526 y Val 349
10	AutoDock 4.2 (-8.24 kcal/mol)	Ile 523, Tyr 355, Leu 352, Ala 527, Val 349 y Leu 531
	GOLD (70.06)	Ile 523, Leu 352, Phe 518, Ala 527, Gly 526 y Val 349
11	AutoDock 4.2 (-7.28 kcal/mol)	Ile 523, Tyr 355, Leu 352, Phe 518, Tyr 385, Ala 527, Val 349 y Leu 531
	GOLD (71.01)	Ile 523, Tyr 355, Leu 352, Phe 518, Ala 527, Val 349 y Leu 531
12	AutoDock 4.2 (-8.68 kcal/mol)	Ile 523, Tyr 355, Leu 352, Phe 518, Ile 517, Ala 527, Val 349 y Leu 531
	GOLD (65.45)	Ile 523, Tyr 355, Leu 352, Tyr 385, His 90 y Ala 527

Los resultados indican que las moléculas **10-12** tienen un modo de unión en la COX-1 similar al del ligando cristalizado celecoxib, ya que, a excepción de la molécula **11** en el acoplamiento realizado en AutoDock Vina, las tres moléculas en los tres programas presentan interacciones que coinciden con el ligando cristalizado y con interacciones ya reportadas para el bolsillo hidrofóbico (Kishore P., 2017; Rimon G., 2010). Sin embargo, como se mencionó, la molécula **11** no presentó interacciones coincidentes en el acoplamiento con AutoDock Vina, pero, en los programas AutoDock 4.2 y GOLD, presentó un modo de unión parecido al modo de unión del ligando cristalizado, además de presentar interacciones reportadas en la literatura. Por otro lado, en la Tabla 17 se muestra que las moléculas **10-12** no presentan enlaces de hidrógeno, por lo que puede provocar una disminución en la actividad inhibitoria en COX-1, pero, por otro lado, estas moléculas presentan las interacciones características para estabilizar los ligandos en el bolsillo hidrofóbico.

Por lo tanto, a pesar de los resultados negativos en uno de los programas y de la falta de enlaces de hidrógeno en AutoDock 4.2 y GOLD, se puede determinar que las moléculas **10–12** podrían presentar afinidad por el sitio activo de la COX-1, y, por lo tanto, podrían ejercer un efecto inhibitorio en esta macromolécula.

8.4.4. Acoplamiento molecular con COX-2

Para el acoplamiento molecular entre las moléculas **1–15** y la COX-2 se seleccionó el reportado para ejercer un efecto inhibitorio en esta macromolécula (Kishore P., 2017; Rimon G., 2010). En la Tabla 18 se muestran los resultados del acoplamiento molecular entre el ligando cristalizado, el ligando creado y las moléculas **1–15** con la COX-2, además de mostrar el RMSD obtenido de la validación del método.

Tabla 18. Puntuación del acoplamiento molecular del ligando cristalizado (AM), ligando creado (AM1) y las moléculas **1–15** con el blanco COX-2 utilizando AutoDock Vina, AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	AutoDock Vina (ΔG kcal/mol)	AutoDock 4.2 (ΔG kcal/mol)	GOLD (chemplp score)
AM	-8.7	-9.56	68.71
AM1	-8.5	-8.75	65.95
RMSD (AM con AM1)	0.870	0.935	0.674
1	-8.6	-9.45	68.33
2	-8.5	-8.36	66.09
3	-8.8	-8.48	70.03
4	-7.8	-8.20	58.73
5	-7.5	-8.67	58.74
6	-7.8	-7.76	68.62
7	-7.8	-6.53	65.53
8	-7.5	-6.39	60.07
9	-7.9	-7.43	68.48
10	-7.1	-7.61	65.29
11	-5.3	-6.69	45.50
12	-7.0	-7.35	59.74
13	-4.7	-3.69	52.33
14	-2.7	-2.3	35.98
15	-4.3	-2.53	43.67

El acoplamiento con AutoDock Vina muestran que el ligando cristalizado (AM) presenta una energía de unión de -8.7 kcal/mol, mientras que el ligando creado (AM1) obtuvo una energía de unión de -8.5 kcal/mol, el RMSD fue de 0.870; esto permite determinar una validación correcta del método. En el caso de AutoDock 4.2 y GOLD, al igual que con Vina, se pueden observar puntajes similares entre el

ligando cristalizado y el ligando creado, además de obtener RMSD menor a 2 en los dos casos, de igual manera, esto determina una validación correcta en los programas utilizados.

La Tabla 18 muestra que, a excepción de la molécula **3**, todas las moléculas presentan una puntuación menor en comparación al ligando cristalizado. Las moléculas que obtuvieron mejores puntuaciones son los derivados de celecoxib **1-3**, esto era de esperarse ya que ciertos grupos presentes en el celecoxib permiten una afinidad y selectividad por este blanco terapéutico. Sin embargo, al igual que con AKR1C3 y COX-1, los criterios de selección de moléculas para realizar el análisis de interacciones se fundamentan en los dos factores ya mencionados previamente, por lo que, siguiendo con la estrategia de evaluar las moléculas que presentan una mayor probabilidad de ser activas en tubulina, se seleccionaron los derivados de ibuprofeno **10-12**. En esta evaluación los derivados de ibuprofeno no obtuvieron las mejores puntuaciones, sin embargo, obtuvieron puntuaciones aceptables para determinar una afinidad por el blanco estudiado.

Para determinar las interacciones presentes entre las moléculas **10-12** y la COX-2 se identificaron las interacciones reportadas con el ligando cristalizado, además de las interacciones reportadas para otros AINEs como el celecoxib. Las interacciones encontradas se presentan en la Tabla 19. Diversos autores plantean que, al igual que en COX-1, el sitio de inhibición de la COX-2 está conservado, incluye residuos hidrofóbicos que forman un bolsillo de estabilidad y enlaces de hidrógeno con residuos que permiten la inhibición de la actividad de esta enzima, como el residuo Tyr 355, Arg 120 y Ser 530 (Dong L., 2016; Kishore P., 2017; Orlando B., 2016).

Tabla 19. Interacciones reportadas en los bolsillos hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno entre el blanco molecular COX-2 y AINEs (Dong L., 2016; Kishore P., 2017; Orlando B., 2016)

Residuo	Tipo de interacción	Residuo	Tipo de interacción
VAL 523	Hidrofóbica	MET 522	Hidrofóbica
TYR 355	Hidrofóbica	ARG 513	Hidrofóbica
LEU 531	Hidrofóbica	GLY 526	Hidrofóbica
VAL 349	Hidrofóbica	LEU 352	Hidrofóbica
ALA 527	Hidrofóbica	SER 353	Hidrofóbica
PHE 381	Hidrofóbica	TYR 385	Enlace de hidrógeno
TRP 387	Hidrofóbica	ARG 120	Enlace de hidrógeno
PHE 518	Hidrofóbica	SER 530	Enlace de hidrógeno

Los autores plantean que las interacciones hidrofóbicas más relevantes son con Val 523, Leu-352, Val 349 y Gly 526, mientras que los enlaces de hidrógeno más representativos se forman con Tyr 385, Arg 120 y Ser 530. Las interacciones que se obtuvieron entre el ligando cristalizado AM, utilizando el programa AutoDock Vina, se pueden observar en la imagen 25 (Dong L., 2016; Kishore P., 2017; Orlando B., 2016).

Como se muestra en la Imagen 25, seis interacciones hidrofóbicas reportadas se encuentran entre el ligando cristalizado y la COX-2. Las interacciones reportadas se presentan con los residuos: Val 523, Leu 352, Val 349, Ala 527, Tyr 355 y Leu 531; los anillos aromáticos del AM son estabilizados por interacciones Pi-sigma con los residuos Val 349 y Ala 527, y por interacciones Pi-alquilo con los residuos Leu 531 y Leu 352, los metilos del AM interaccionan con residuos hidrofóbicos mediante interacciones alquilo-alquilo; en este acoplamiento se presenta un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo de AM y el hidroxilo fenólico de la Tyr 385. Como se observa, el ligando cristalizado presenta afinidad por el sitio activo de COX-2, ya que presenta las interacciones hidrofóbicas reportadas para permitir la

estabilización de los ligandos en el bolsillo hidrofóbico y el enlace de hidrógeno característico para permitir una inhibición de este blanco, esto indica que el modo de unión del ligando de referencia AM identificado por acoplamiento molecular es similar al identificado con el ligando cristalizado por Orlando, además de presentar interacciones reportadas para otras moléculas cristalizadas en este sitio activo (Orlando B., 2016; Wang J. L. D., 2010).

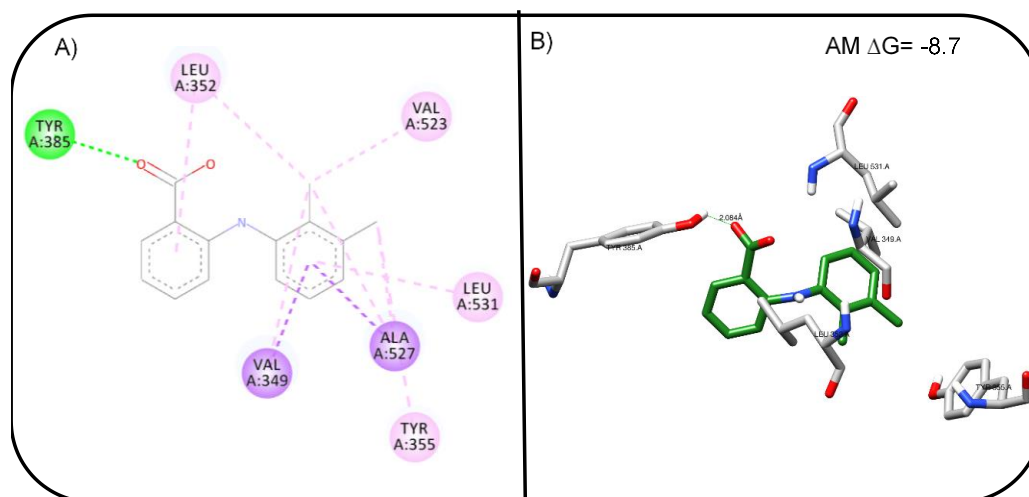


Imagen 25. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y el ligando cristalizado AM en 2D, y B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y el ligando cristalizado AM en 3D.

Las interacciones encontradas en el acoplamiento molecular entre la molécula **10** y la COX-2 ($\Delta G = -7.1$ kcal/mol) se pueden observar en la Imagen 26. Este compuesto presenta algunas interacciones que coinciden con las reportadas para el ligando cristalizado y otros AINEs. La molécula **10** presenta siete interacciones hidrofóbicas reportadas: Val 523, Leu 531, Val 349, Ala 527, Gly 526, Leu 532 y Ser 353, presenta dos enlaces de hidrógeno, uno reportado y uno no reportado con Tyr 385 y con Gly 526, además presenta una interacción del tipo Pi-cación entre el anillo no sustituido de la molécula **10** y la imina de la Arg 513, esto permite la estabilización de uno de los anillos, sin embargo, no es la única interacción que interviene en la estabilización de los anillos, los anillos de la molécula evaluada presentan interacciones Pi-sigma con los residuos Ser 353, Val 523, Leu 352 y Ala 527, por

último, interacciones Pi-alquilo con los residuos Leu 352, Val 523 y Val 349; la cadena alifática interacciona con los residuos Leu 531, Val 349 y Ala 527 por medio de interacciones alquilo-alquilo; los enlaces de hidrógeno se dan entre el oxígeno del carbonilo y el hidroxilo fenólico de Tyr 385, y entre el oxígeno del carboxilato con el grupo amino de la Gly 526, enlace no reportado (Imagen 26 A y C). Realizando el análisis de las interacciones que presenta la molécula **10** con el sitio activo de COX-2, se puede predecir que, al igual que el ligando cristalizado, la molécula evaluada podría presentar afinidad por este sitio, además, uno de los enlaces de hidrógeno encontrados indica que esta molécula podría inhibir la actividad de este blanco terapéutico (Imagen 26 B y C) (Orlando B., 2016; Wang J. L. D., 2010).

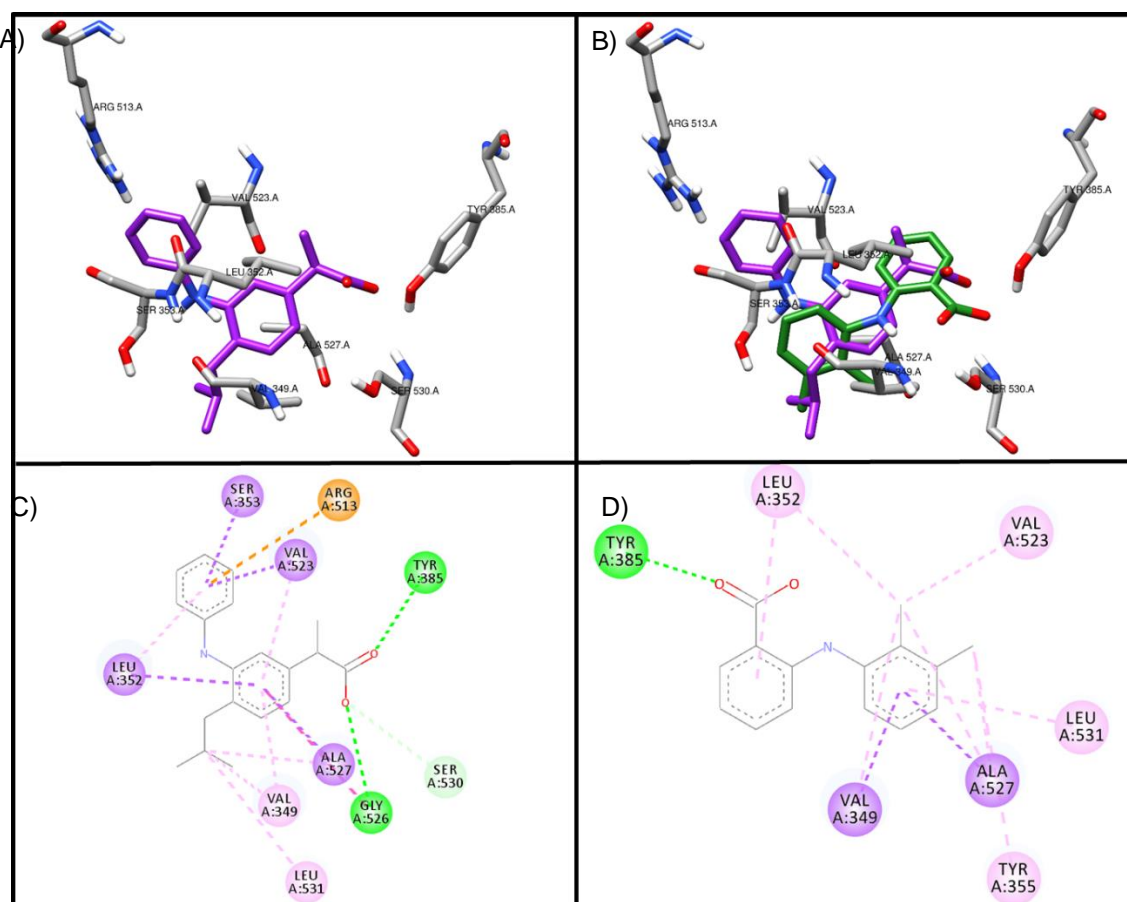


Imagen 26. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **10** (morado) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **10** (morado) en presencia del ligando cristalizado AM (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del

acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **10** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y el ligando cristalizado AM en 2D.

Las interacciones encontradas en el acoplamiento molecular entre la molécula **11** y la COX-2 ($\Delta G = -5.3$ kcal/mol) se pueden observar en la Imagen 27. Esta molécula, al igual que la molécula **10**, presenta interacciones que coinciden con las reportadas para el ligando cristalizado y otros AINEs, sin embargo, las interacciones que presenta no son tan favorables como se esperaba, esto se puede notar en la energía de unión obtenida, es una energía aceptable, pero no tan buena como las presentadas anteriormente, no obstante la molécula presenta afinidad por este sitio; presenta ocho interacciones hidrofóbicas: Val 523, Tyr 355, Leu 531, Val 349, Ala 527, Phe 518, Met 522 y Leu 352, además presenta dos enlaces de hidrógeno reportados en la literatura, estos enlaces se presentan con los residuos Ser 530 y Arg 120. La estabilización de los anillos se da por la interacción Pi-sigma con Ala 527 y con interacciones Pi-alquilo con los residuos: Leu 352 y Val 349, aquí se puede mostrar que son menos las interacciones que estabilizan los anillos aromáticos, esto podría explicar la energía de unión obtenida, la cual no es tan conveniente en comparación con el ligando cristalizado. Las cadenas alifáticas interaccionan con residuos hidrofóbicos por interacciones alquilo-alquilo, y, por último, los enlaces de hidrógeno se dan entre el oxígeno del carboxilato y el grupo amino de la Ser 530 y entre un metoxilo de la molécula y el grupo amino terminal de Arg 120 (Imagen 27 A y C). Estas interacciones indican que la molécula **11** podría tener afinidad por COX-2, sin embargo, la energía de unión obtenida no es tan buena como la encontrada con la molécula **10** o el ligando cristalizado, por lo que podría presentar menor afinidad a COX-2 (Imagen 27 B y C) (Kishore P., 2017; Orlando B., 2016).

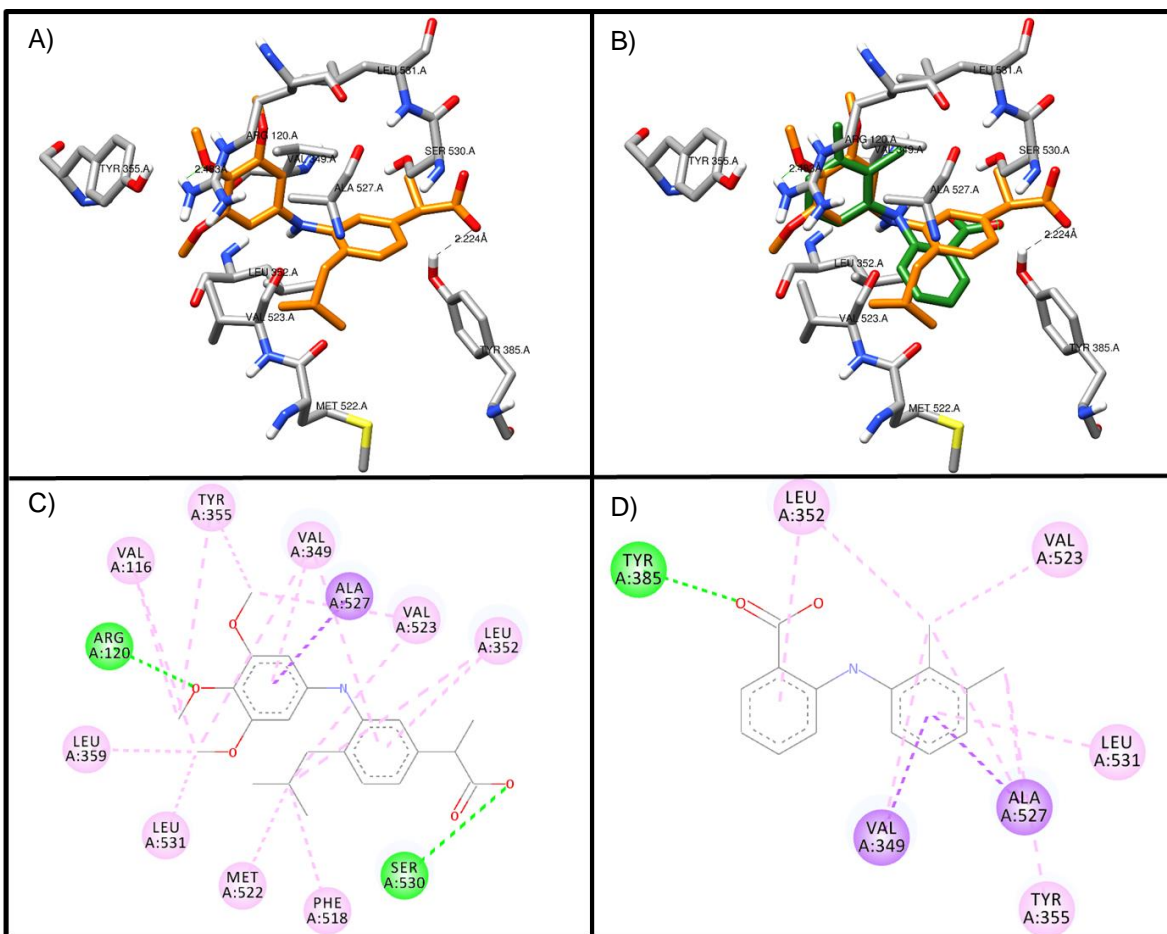


Imagen 27. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **11** (naranja) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **11** (naranja) en presencia del ligando cristalizado AM (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **11** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y el ligando cristalizado AM en 2D.

La molécula **12** presenta algunas interacciones reportadas para el sitio activo de este blanco ($\Delta G = -7.0$ kcal/mol), dichas interacciones se muestran en la Imagen 28. En la imagen se pueden observar nueve interacciones hidrofóbicas y en este acoplamiento no se obtuvieron enlaces de hidrógeno (Imagen 28 A y C). Las interacciones hidrofóbicas encontradas son con los residuos: Val 523, Leu 531, Val 349, Ala 527, Phe 518, Arg 513, Gly 526, Leu 352 y Ser 353. La estabilización de los anillos de la molécula **12** se da por una interacción de apilamiento N-H-Pi con el

residuo Gly 526, por interacciones Pi-sigma con Ala 527, Leu 352, Val 523 y Ser 353, además, los anillos también son estabilizados por interacciones Pi-alquilo con los residuos Val 349 y Val 523, estas interacciones indican que los anillos se estabilizan en el bolsillo hidrofóbico formado por los residuos ya mencionados; las cadenas alifáticas de esta molécula interactúan con residuos hidrofóbicos por interacciones alquilo-alquilo con los residuos Ala 527, Leu 531 y Val 349; el grupo metoxilo presenta interacciones hidrofóbicas del tipo alquilo-alquilo con His 90, Arg 513 y Ala 516, estas dos últimas no reportadas, además de formar una interacción carbono-hidrógeno con el residuo Phe 518. A pesar de que esta molécula no presentó ningún enlace de hidrógeno, se puede determinar que la molécula tiene probabilidades de presentar afinidad a este sitio activo de la COX-2, la energía obtenida y las interacciones presentadas indican una probable estabilización de la molécula, por lo tanto, al igual que el blanco cristalizado, podría permitir la unión y un efecto inhibitorio sobre esta macromolécula (Imagen 28 B y D) (Orlando B., 2016; Wang J. L. D., 2010).

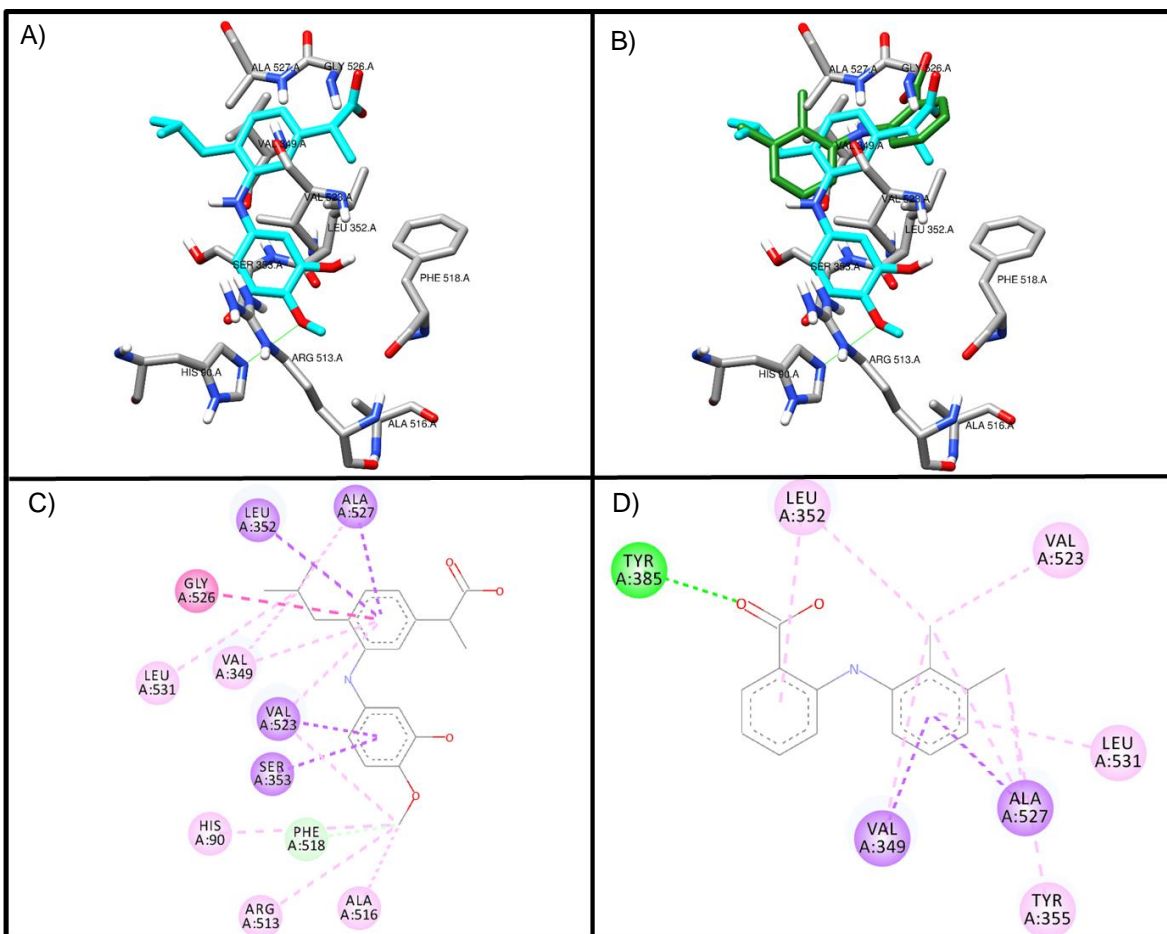


Imagen 28. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **12** (cian) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **12** (cian) en presencia del ligando cristalizado AM (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y la molécula **12** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el blanco molecular COX-2 y el ligando cristalizado AM en 2D.

En la Tabla 20 se muestra el análisis de las interacciones presentes entre las moléculas **10–12** y el ligando cristalizado Celecoxib con el blanco COX-2 utilizando los programas AutoDock 4.2 y GOLD.

Tabla 20. Interacciones presentes entre el ligando cristalizado AM, las moléculas **10–12** y el blanco COX-2 con los programas AutoDock 4.2 y GOLD

Molécula	Programa (Puntuación)	Interacciones
AM	AutoDock 4.2 (-9.56 kcal/mol)	Val 523, Leu 531, Val 349, Ala 527, Leu 352, Tyr 385 (H)
	GOLD (68.71)	Val 523, Leu 531, Val 349, Ala 527, Phe 518, Gly 526, Leu 352, Tyr 385 (H), Ser 530 (H)
10	AutoDock 4.2 (-7.61 kcal/mol)	Ser 530, Val 523, Tyr 355, Leu 531, Val 349, Ala 527, Leu 352
	GOLD (65.29)	Val 523, Ala 527, Gly 526, Leu 352, Tyr 355 (H), Arg 120 (H)
11	AutoDock 4.2 (-6.69 kcal/mol)	Val 523, Leu 531, Val 349, Ala 527, Met 522, Leu 352, Ser 530 (H), Arg 120 (H)
	GOLD (45.50)	Tyr 385, Val 523, Leu 531, Val 349, Ala 527, Trp 387, Met 522, Gly 526, Leu 352, Ser 530 (H), Tyr 355 (H), Arg 120 (H)
12	AutoDock 4.2 (-7.35 kcal/mol)	Ser 530, Val 523, Tyr 355, Leu 531, Val 349, Ala 527, Phe 518, Leu 352
	GOLD (59.74)	Tyr 385, Val 523, Leu 531, Val 349, Ala 527, Trp 387, Phe 518, Gly 526, Leu 352, Ser 353

Los resultados indican que las moléculas **10–12** tienen un modo de unión en la COX-2 similar al del ligando cristalizado AM y otros AINEs, esto es debido a que las tres moléculas, en los tres programas utilizados, presentan interacciones coincidentes con las reportadas y con las presentes en el ligando cristalizado AM, además de contener las interacciones relevantes para obtener afinidad por este sitio, es decir, interacciones con Val 523, Ala 517 y Leu 352 (Kishore P., 2017; Orlando B., 2016). Sin embargo, la molécula **11** presenta puntajes menores en comparación con las moléculas **10, 12** y el ligando cristalizado; como se pudo observar, esta molécula en especial carece de diversas interacciones que estabilizan los anillos, es por ello que las bajas puntuaciones podrían ser resultado de este efecto, no obstante, los

puntajes, a pesar de ser bajos, y las interacciones encontradas permiten determinar que la molécula **11** podría tener afinidad por el sitio activo de la COX-2, a pesar de ello, esta molécula podría presentar afinidad baja en comparación con las moléculas **10** y **12** o con el ligando cristalizado.

En resumen, a partir de la evaluación de las interacciones presentes en el acoplamiento molecular entre las moléculas **10–12** y los blancos moleculares ya mencionados, se determinó que las tres moléculas podrían tener afinidad por los distintos sitios de los blancos moleculares evaluados: sitio de la colchicina en la tubulina, sitio activo de AKR1C3, sitio activo de COX 1 y 2. Es por ello que, aunado a lo detallado en este análisis, se propone que las moléculas **10–12** podrían presentar citotoxicidad en un ensayo *in vitro*; esta actividad biológica podría darse debido a los efectos de unión en los blancos moleculares evaluados y relacionados con cáncer; aunque el blanco principal y directamente relacionado con una actividad citotóxica es la tubulina, la inhibición de los otros tres blancos moleculares estudiados podría coadyuvar a obtener un efecto citotóxico potenciado por un efecto polifarmacológico, esto debido a los estudios detallados anteriormente en donde se especifica la relación de los blancos terapéuticos estudiados con la generación o supervivencia de los tumores, y, por lo tanto, del cáncer (Brouhard G., 2018; El Sayed M., 2018; Flanagan J., 2012).

8.4.5. Acoplamiento molecular dirigido a los distintos sitios de la tubulina con AutoDock Vina

Para determinar si las moléculas **10–12** podrían tener selectividad única por el sitio de la colchicina en la tubulina, se procedió a realizar el acoplamiento molecular en los distintos sitios reportados de la tubulina utilizando el programa AutoDock Vina. Los archivos obtenidos de PDB para su utilización en el cálculo de acoplamiento molecular son: complejo tubulina-laulimalida-epotilona A, para el sitio de unión de la laulimalida (4O4I), complejo tubulina-espongistatina, para el sitio de unión de la maitansina (6FII), complejo tubulina-pironetina, para el sitio de unión de la pironetina (5LA6), complejo tubulina-vinblastina, para el sitio de unión de los alcaloides de la

vinca (4EB6) y el complejo tubulina-ciclostreptina, para el sitio de unión del taxano (6QTN). En la Tabla 21 se pueden observar los resultados de estos cálculos.

Tabla 21. Conformaciones obtenidas del acoplamiento molecular en los diferentes sitios de unión de la tubulina con AutoDock Vina.

Sitio Activo	Molécula	Energía de unión (ΔG kcal/mol)
Laulimalida	10	N/A
	11	N/A
	12	N/A
Maitansina	10	N/A
	11	N/A
	12	N/A
Pironetina	10	N/A
	11	N/A
	12	N/A
Vinca	10	N/A
	11	N/A
	12	N/A
Taxano	10	-7.1
	11	-6.9
	12	-7.0

Como se observa en la tabla, el único sitio en el que las moléculas **10–12** se unen es el sitio del taxano, por lo que se procedió a realizar el análisis de las conformaciones unidas a este sitio. En la Tabla 22 se muestran las interacciones reportadas para el ligando cristalizado y para el taxol (Balaguer F., 2019; Löwe J., 2001).

Tabla 22. Interacciones reportadas de la ciclostreptina y taxol en el sitio del taxano en la tubulina (Balaguer F., 2019) (Löwe J., 2001)

Residuo	Tipo de interacción	Residuo	Tipo de interacción
ASP 226	Hidrofóbica	LEU 230	Hidrofóbica
LEU 217	Hidrofóbica	HIS 229	Hidrofóbica
ALA 233	Hidrofóbica	SER 236	Hidrofóbica
LEU 371	Hidrofóbica	PHE 272	Hidrofóbica
VAL 23	Hidrofóbica	PRO 274	Hidrofóbica
ASP 26	Hidrofóbica	LEU 275	Hidrofóbica
LEU 219	Hidrofóbica	THR276	Hidrofóbica
SER 277	Hidrofóbica	ARG 278	Hidrofóbica
PRO 360	Hidrofóbica	GLY 370	Hidrofóbica
ARG 369	Hidrofóbica	HIS 229	Enlace de hidrógeno

Una vez obtenidas las interacciones reportadas, se procedió a realizar el cálculo del acoplamiento molecular entre el ligando cristalizado y el sitio activo de los taxanos de la tubulina con AutoDock Vina. En la Imagen 29 se puede observar el modo de unión del ligando cristalizado ($\Delta G = -7.5$ kcal/mol) en el sitio del taxano.

La Imagen 29 muestra las interacciones obtenidas en el acoplamiento molecular, se presentan cinco interacciones hidrofóbicas reportadas y dos enlaces de hidrógeno no reportados. Presenta una interacción Pi-alquilo con el anillo de imidazol de His 229, además de interacciones alquilo-alquilo con los residuos Ala 233, Val 23, Pro 360 y Arg 369; los enlaces de hidrógeno se presentan con Arg 369 y con Gly 370, estos enlaces no están reportados aun, sin embargo, las interacciones hidrofóbicas encontradas indican que el modo de unión del ligando de referencia obtenido con AutoDock Vina, coincide con lo reportado para los ligandos cristalizados ciclostreptina y taxol (Balaguer F., 2019; Löwe J., 2001).

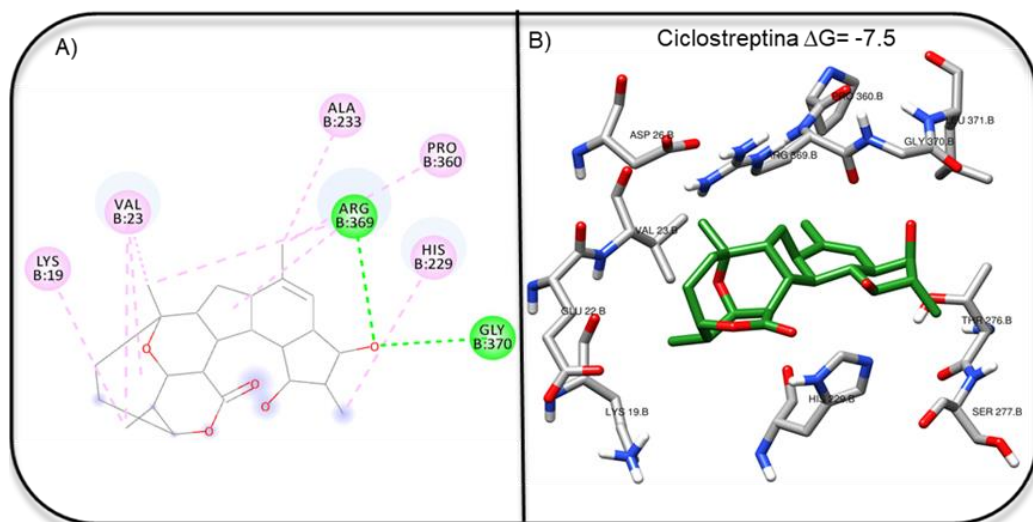


Imagen 29. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el ligando cristalizado y el sitio activo de los taxanos de la tubulina en 2D, y B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el ligando cristalizado y el sitio activo de los taxanos de la tubulina en 3D.

En la Imagen 30 se muestran las interacciones obtenidas entre la molécula **10** y el sitio del taxano en la tubulina ($\Delta G = -7.1$ kcal/mol). En este acoplamiento se encontraron tres interacciones hidrofóbicas reportadas y un enlace de hidrógeno no reportado (Imagen 30 A y C). El anillo de la molécula **10** es estabilizado por una interacción Pi-sigma con Val 23, además, presenta una interacción Pi-alquilo con Arg 369 y una interacción Pi-donador de enlace de hidrógeno con His 229; el enlace de hidrógeno no reportado se da entre el oxígeno del carbonilo de la molécula evaluada y el grupo amino de Arg 369. Como se muestra en la Imagen 30 B y D, el modo de unión de la molécula **10** es similar al del ligando cristalizado, sin embargo, solamente se encontraron tres interacciones reportadas, esto puede indicar que la molécula evaluada pudiera ejercer un efecto en este sitio activo, no obstante, las interacciones encontradas no determinan una afinidad definida para esta molécula (Balaguer F., 2019; Löwe J., 2001).

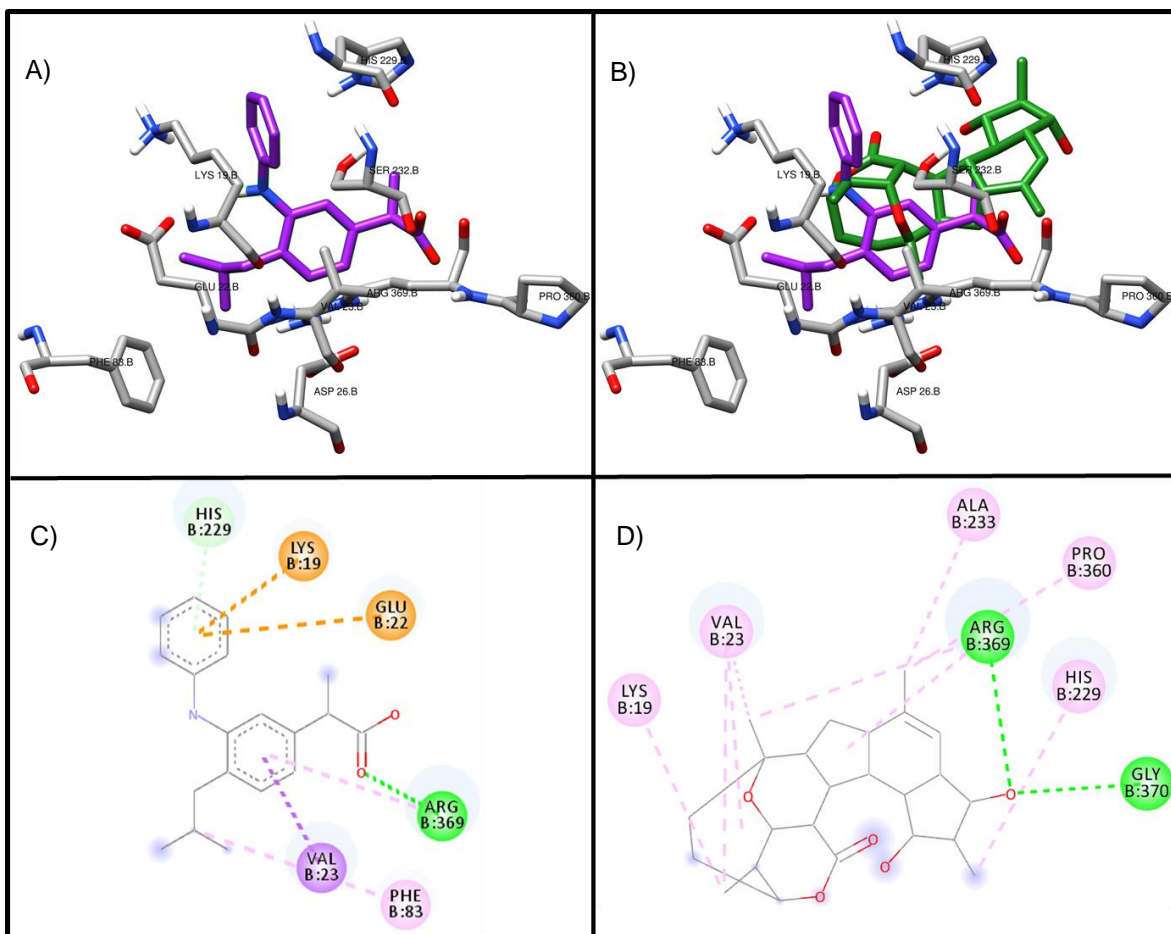


Imagen 30. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **10** (morado) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **10** (morado) en presencia del ligando cristalizado ciclosporina (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **10** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y el ligando cristalizado ciclosporina en 2D.

La Imagen 31 muestra las interacciones encontradas entre la molécula **11** y el sitio del taxano en la tubulina ($\Delta G = -6.9$ kcal/mol). Se encontraron seis interacciones hidrofóbicas reportadas y un enlace de hidrógeno no reportado (Imagen 31 A y C). La estabilización de los anillos de la molécula **11** se da por un apilamiento Pi-Pi con His 226, por una interacción Pi-sigma con Val 23 y por interacciones Pi-alquilo con los residuos Val 23 y Ala 233; los grupos metoxilo de la molécula presentan interacciones alquilo-alquilo con los residuos His 229, Pro 360, Ala 233, Phe 272,

Leu 371 y Val 23; el enlace de hidrógeno encontrado no reportado se da entre el oxígeno del carboxilato de la molécula y el grupo carbonilo de Gly 225. Sin embargo, se encontró una interacción no favorable en este acoplamiento con Ser 232, esto pudo provocar que la energía de unión fuera menos negativa en comparación con las moléculas **10**, **12** y el ligando cristalizado, no obstante, como se muestra en la imagen, el modo de unión de la molécula **11** es similar al modo de unión del ligando de referencia, además, el análisis de interacciones permite determinar que se encontraron interacciones que coinciden con las encontradas para la ciclostreptina y el taxol, por lo que, se puede determinar que la molécula **11**, podría presentar afinidad y provocar una actividad biológica a consecuencia de la unión en el sitio del taxano de la tubulina (Imagen 31 B y D) (Balaguer F., 2019; Löwe J., 2001).

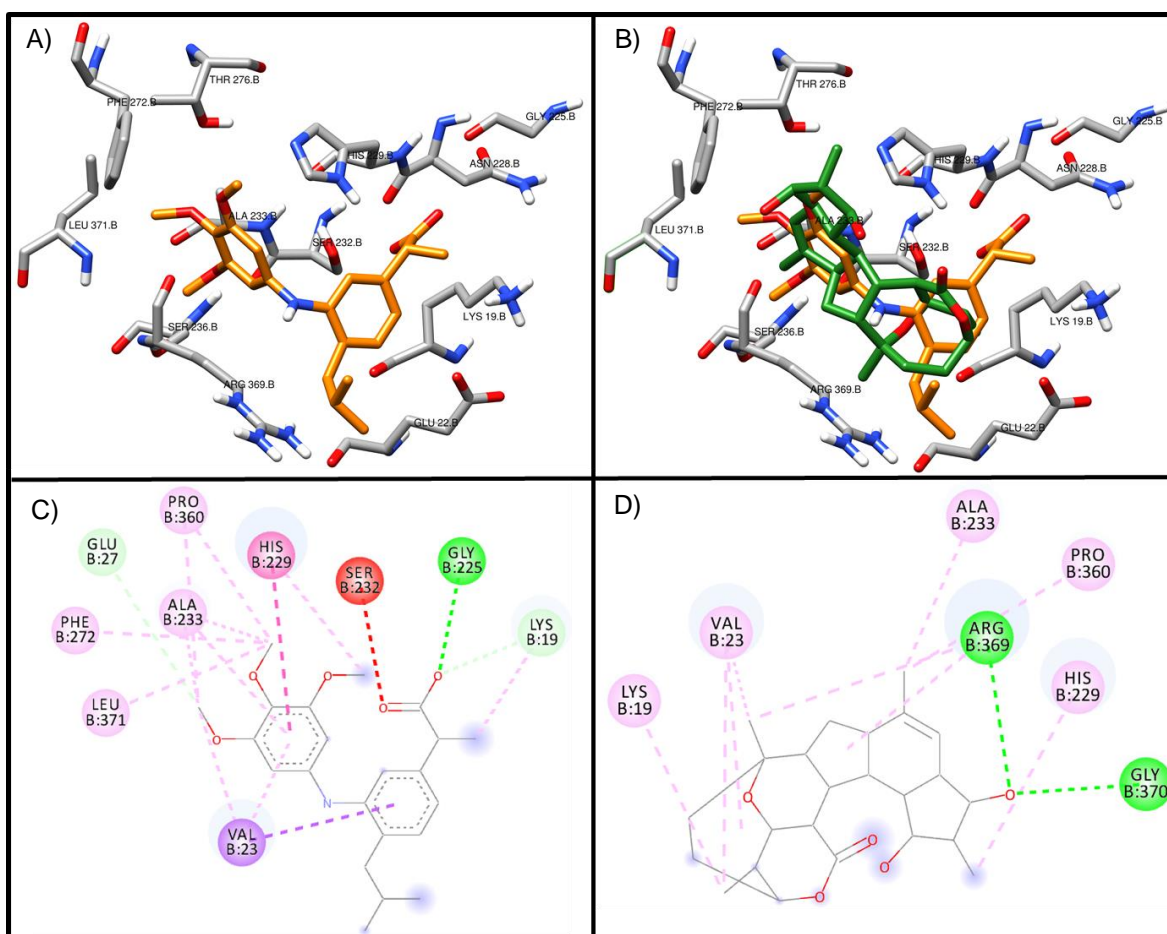


Imagen 31. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **11** (naranja) en 3D. B) Interacciones obtenidas del

acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **11** (naranja) en presencia del ligando cristalizado ciclostreptina (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **11** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y el ligando cristalizado ciclostreptina en 2D.

Por último, en la Imagen 32 se muestran las interacciones obtenidas entre la molécula **12** y el sitio del taxano en la tubulina ($\Delta G = -7.0$ kcal/mol). Esta molécula presenta solamente tres interacciones hidrofóbicas reportadas y dos enlaces de hidrógeno no reportados (Imagen 32 A y C). La estabilización de los anillos se da por una interacción Pi-sigma con Val 23, por interacción Pi-alquilo con Arg 369 y por una interacción Pi-donador de enlace de hidrógeno con His 229; solamente se encontró una interacción alquilo-alquilo entre la cadena alifática de la molécula evaluada y Val 23; los enlaces de hidrógeno no reportados se dan entre el grupo hidroxilo de la molécula **12** y el oxígeno carbonílico de Asn 228, y entre el oxígeno del carboxilato de la molécula **12** y el oxígeno carbonílico de Arg 369. Como se puede observar, al igual que la molécula **11**, la molécula **12** presenta una interacción desfavorable con Ser 232, sin embargo, como se muestra en la imagen, el modo de unión de esta molécula es similar al encontrado con el ligando cristalizado ciclostreptina, no obstante, se encontraron pocas interacciones hidrofóbicas que estabilizan el ligando, aunque el modo de unión y las interacciones presentes en la molécula **12** indican que la molécula podría tener afinidad por el sitio del taxano en la tubulina, esta afinidad podría ser reducida debido a las pocas interacciones encontradas (Imagen 32 B y D) (Balaguer F., 2019; Löwe J., 2001).

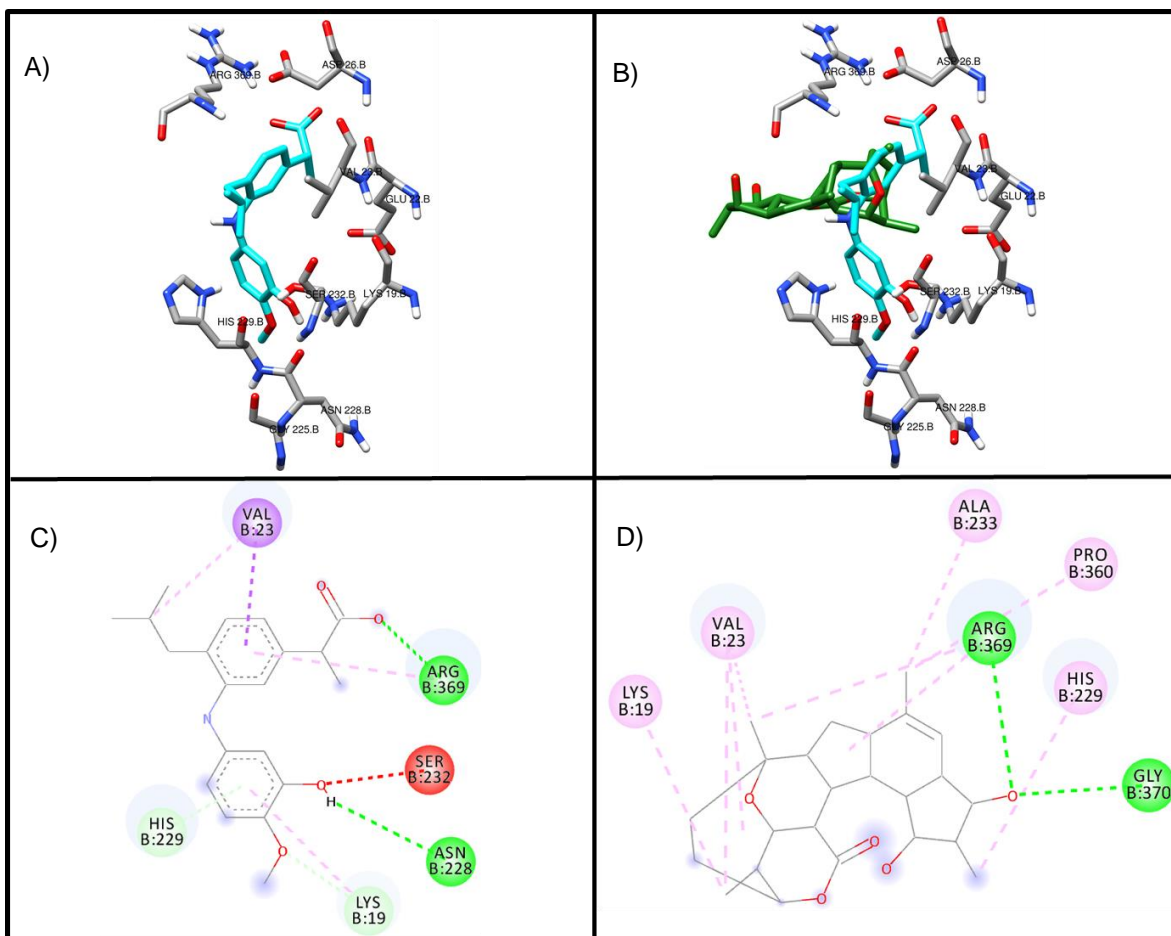


Imagen 32. A) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **12** (cian) en 3D. B) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **12** (cian) en presencia del ligando cristalizado ciclosporina (verde) en 3D. C) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y la molécula **11** en 2D, y D) Interacciones obtenidas del acoplamiento molecular con AutoDock Vina entre el sitio del taxano de la tubulina y el ligando cristalizado ciclosporina en 2D.

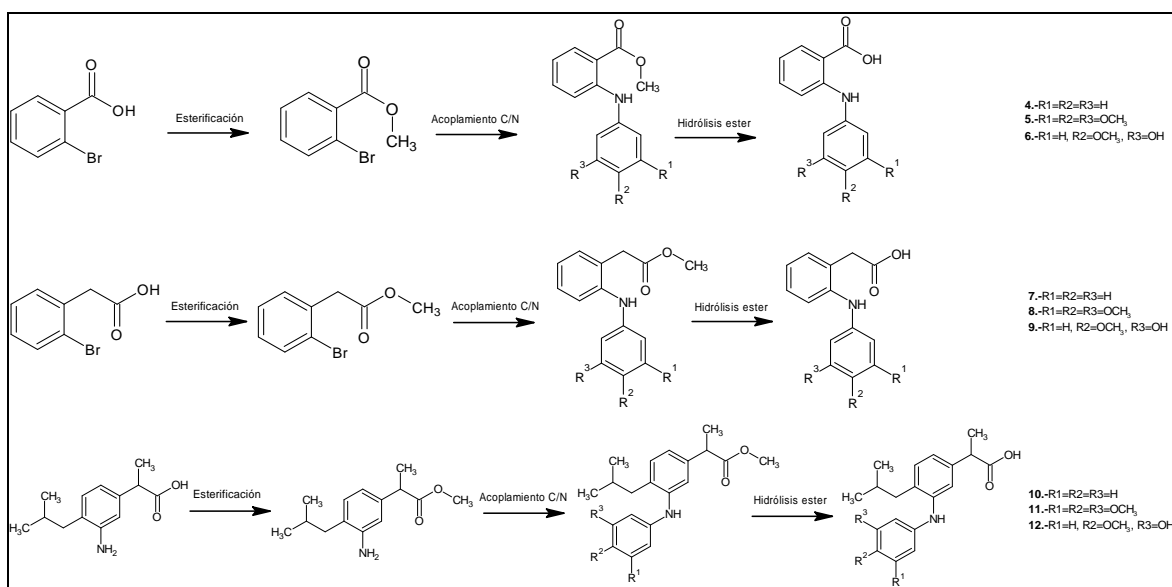
En resumen, este análisis permite determinar que, debido a la energía de unión encontrada, las moléculas **10–12** podrían presentar afinidad por el sitio del taxano en la tubulina, sin embargo, estos resultados no son determinantes, ya que se encontraron pocas interacciones reportadas en el acoplamiento molecular, esto podría influir para un escaso efecto biológico. Como se mostró, las moléculas **10–12** presentan mejor energía de unión sobre el sitio de unión de la colchicina en tubulina, permitiéndoles tener mayor afinidad hacia este sitio, sumado al análisis de

interacciones que indica que estas moléculas interaccionan de mejor manera en este sitio, por lo que, a pesar de presentar afinidad por el sitio del taxano en tubulina, el análisis realizado permite proponer que las moléculas **10–12** tendrán preferencia por el sitio de colchicina, provocando una desestabilización de los microtúbulos y, por lo tanto, un bloqueo en la continuación de la mitosis, induciendo la apoptosis o bien, revirtiendo el ciclo celular a la fase G2, en donde no se presenta la división celular (Heldman A, 2001).

8.5. Síntesis química

8.5.1. Exploración de metodologías de síntesis

Para los estudios de síntesis química, se tomó la decisión de explorar estrategias para sintetizar los compuestos derivados de ácido mefenámico, diclofenaco e ibuprofeno (**4–12**), ya que los derivados de ibuprofeno, los compuestos que presentaron mejores resultados en los estudios *in silico*, están incluidos en estos compuestos, además, las tres series de compuestos siguen una estrategia de síntesis similar, es decir, una esterificación del ácido carboxílico presente, un acoplamiento carbono-nitrógeno y, por último, una hidrólisis del éster (Esquema 2).



Esquema 2. Estrategia de síntesis para los derivados **4–12**

El Esquema 2 muestra las etapas a seguir para la síntesis química de estos compuestos. El primer paso requiere de una esterificación del ácido carboxílico, esta etapa sirve para proteger al carboxilo, para así, evitar que este grupo presente interferencia en la siguiente etapa: el acoplamiento carbono-nitrógeno. Esta etapa es fundamental en la ruta de síntesis, debido a que este acoplamiento permite la incorporación del anillo aromático que presenta los sustituyentes de interés, por último, se requiere realizar una hidrólisis del éster, debido a que, como se mostró, el oxígeno del carboxilato es necesario para formar enlaces de hidrógeno con los blancos moleculares evaluados.

Para la esterificación, se identificó que la esterificación de Fischer es de las técnicas más utilizadas, en esta técnica es necesario un ácido carboxílico, un alcohol y un catalizador ácido para la formación del éster. Una de las principales ventajas de esta técnica es su simplicidad y la obtención de buenos rendimientos en la reacción (Fischer E., 1895).

Para el acoplamiento C-N se identificaron tres metodologías ampliamente utilizadas, la primera de ellas es el acoplamiento C-N de Ullman, en donde se utiliza cobre como catalizador, sin embargo, esta metodología presentó nulos rendimientos en los estudios preliminares (Ullman F., 1903). La segunda metodología explorada fue el acoplamiento C-N de Chan Lam, esta metodología, al igual que la reacción de Ullman, utiliza cobre como catalizador, con la diferencia de presentar distintas condiciones de reacción; en los estudios preliminares de síntesis no se obtuvieron los productos deseados, además de que las condiciones de reacción complicaban la parte experimental, ya que esta metodología menciona que los tiempos de reacción alcanzaban las 48 horas (Reddy A., 2017). Afortunadamente, se identificó que los mejores rendimientos se obtenían con la metodología propuesta por Wolfe y Buchwald.

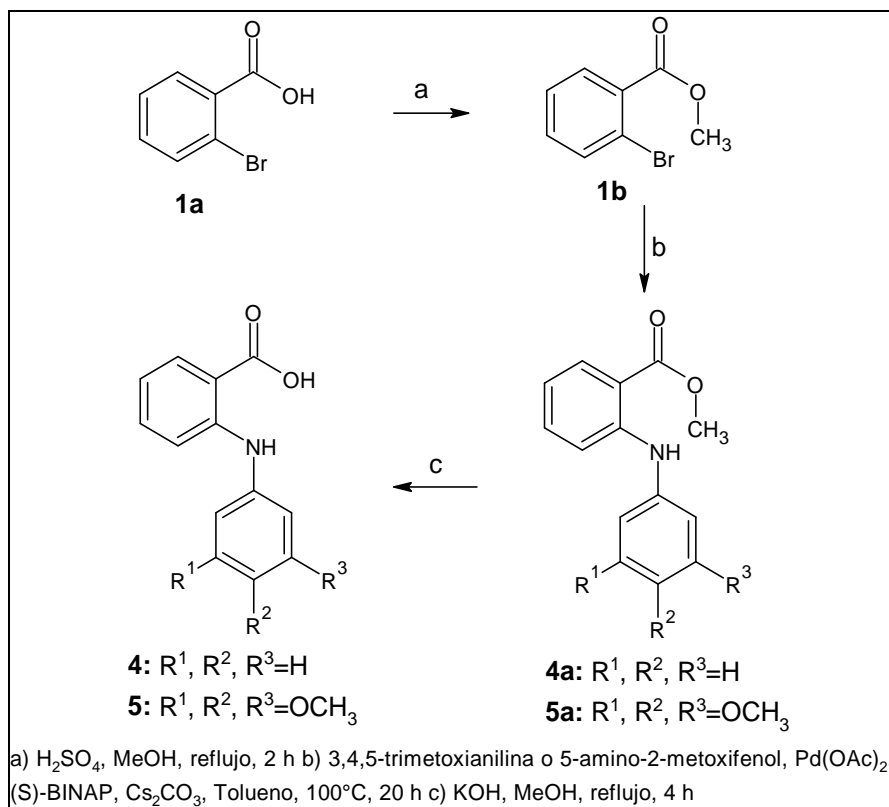
El acoplamiento C-N descrito por Wolfe y Buchwald permite la síntesis de arilaminas a través del acoplamiento cruzado de aminas con haluros de arilo, esta reacción utiliza como catalizador el paladio, una base determinada dependiendo de los reactivos a utilizar y un ligante de fosfina como el BINAP. Con el paso de los años

se han realizado variaciones a este método para obtener mejores rendimientos, por lo que se determinó utilizar esta metodología para la síntesis de las moléculas **4–12** (Wolfe P., 1998).

Por último, se determinó que la metodología a utilizar para la hidrólisis del éster es la hidrólisis básica de ésteres o saponificación, esta reacción utiliza una base fuerte, comúnmente NaOH o KOH, esta reacción se realiza en un medio acuoso o con algunos disolventes de cadena corta como el metanol. Se ha reportado que la utilización de esta metodología propicia la obtención de buenos rendimientos de reacción (Theodorou V., 2007).

*8.5.2. Síntesis de derivados de ácido mefenámico y propuesta de síntesis para los derivados **10–12***

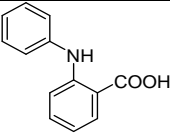
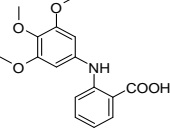
Una vez identificadas las metodologías experimentales a utilizar en la síntesis, se procedió a realizar la parte experimental. Debido a la falta de materias primas para la elaboración de los derivados de ibuprofeno **10–12**, se procedió a sintetizar los derivados de ácido mefenámico **4** y **5**, esto con la finalidad de estandarizar un método general para la síntesis de los derivados de ibuprofeno. En el Esquema 3 se muestra la reacción global para la síntesis de las moléculas **4** y **5**.



Esquema 3. Condiciones de reacción utilizadas para la síntesis de las moléculas **4** y **5**

En la Tabla 23 se resumen las principales características de las moléculas sintetizadas **4** y **5**, como se observa, en la ruta de síntesis de la molécula **4**, Ácido N-fenilantranílico, se logró un rendimiento global del 78%, es un rendimiento relativamente alto. Se obtuvo un producto en estado sólido, permitiendo obtener su punto de fusión, el cual fue de $186\text{--}187^\circ C$, esto concordando con bibliografía consultada en donde se menciona que el punto de fusión de esta molécula es de $186\text{--}187^\circ C$ (Neukom J., 2011). En el caso de la segunda molécula (**5**), Ácido N-(3,4,5-trimetoxi)-fenilantranílico, se obtuvo un rendimiento global de 71%, esta molécula no está reportada, por lo que no es posible hacer una comparación del punto de fusión, el cual es de $168\text{--}169^\circ C$.

Tabla 23. Principales características de las moléculas sintetizadas

Molécula	Nombre de la molécula	Estructura molecular	Rendimiento	Punto de fusión (°C)
4	Ácido N-fenilantranílico		78%	186–187
5	Ácido N-(3,4,5-trimetoxi)-fenilantranílico		71%	168–169

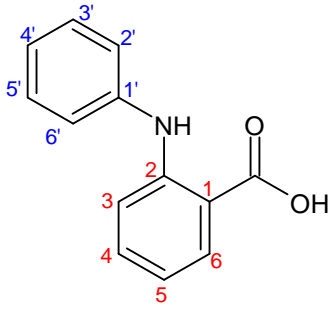
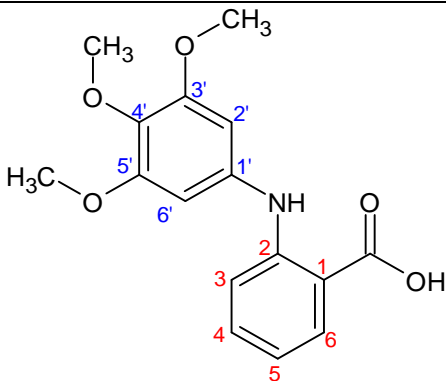
En la elucidación estructural de los híbridos sintetizados, podemos mostrar las señales representativas del espectro de infrarrojo, estos espectros fueron obtenidos en un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier marca Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum RX 1, el análisis de las moléculas se realizó en pastilla de bromuro de potasio. En la Tabla 24 se muestran las señales representativas de los grupos funcionales presentes en los derivados sintetizados, las frecuencias de señales se reportan en cm^{-1} . Entre 3336 y 3483 se encuentran los estiramientos N-H de las aminas secundarias aromáticas, entre 2955 y 3038 el estiramiento O-H del ácido carboxílico, en 1658 y 1712 se encuentran las señales correspondientes al estiramiento C=O del ácido carboxílico, entre 746 y 749 se encuentran las señales correspondientes a la flexión N-H de balanceo. Esta información permite determinar que los grupos funcionales representativos están presentes en las moléculas sintetizadas (Lozada M., 2013).

Tabla 24. Señales características del espectro IR de las moléculas obtenidas en cm^{-1}

Compuesto	Estiramiento N-H	Estiramiento O-H	Estiramiento C=O	Flexión N-H
4	3336	3038	1658	746
5	3483	3000	1663	747

Para complementar la información obtenida por espectroscopía de infrarrojo, las moléculas fueron caracterizadas utilizando ^1H RMN y ^{13}C RMN. Los resultados de las señales representativas de ^1H RMN y ^{13}C RMN para las moléculas 4 y 5 se muestran en las Tablas 25 y 26 respectivamente.

Tabla 25. Señales características de ^1H RMN de las moléculas **3** y **4** obtenidas en ppm

Estructura		
Protón	Molécula 4 (δ en ppm)	Molécula 5 (δ en ppm)
2' y 6'	7.29 – 7.25 (m, 2H)	6.52 (s, 2H)
3' y 5'	7.41 – 7.31 (m, 3H)	N/A
4'	7.16 – 7.11 (m, 1H)	N/A
3	7.23 (dd, J = 8.5, 0.6 Hz, 1H)	7.18 (dd, J = 8.6, 0.6 Hz, 1H)
4	7.41 – 7.31 (m, 3H)	7.37 (ddd, J = 8.6, 7.0, 1.7 Hz, 1H)
5	6.77 – 6.74 (m, 1H)	6.78 – 6.74 (m, 1H)
6	8.05 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H)	8.05 (dd, J = 8.1, 1.6 Hz, 1H)
NH	9.32 (s, 1H)	9.22 (s, 1H)
COOH	12.15 (s, 1H)	No observada
OCH ₃	N/A	3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 6H)

Como se observa, las señales del desplazamiento químico dependen de las propiedades electronegativas de los átomos, en general, las señales de los protones 3-6 y el protón de la amina presentan desplazamientos químicos similares en los espectros de las dos moléculas estudiadas, esto comprueba la presencia del grupo ácido benzoico y el grupo amino en ambos espectros. Las señales de los protones 3'-5' no están presentes en el espectro de la molécula **5**, esto indica la presencia de sustituyentes en esas posiciones, en este caso los grupos metoxilo. Además, se puede observar que a diferencia del espectro de la molécula **5**, en el espectro de la molécula **4**, no se encuentran las señales características para los protones de los grupos metoxilo, por lo que se puede identificar que los espectros corresponden a las moléculas sintetizadas. Por último, la señal del protón del ácido carboxílico solamente es observada en el espectro de la molécula **4**, en el espectro de la molécula **5**, la señal no es observada debido a que en este caso la ventana espectral

llega hasta 12 ppm, pudiendo perderse la señal al presentar un desplazamiento químico mayor a 12 ppm (Imagen 33 y 34).

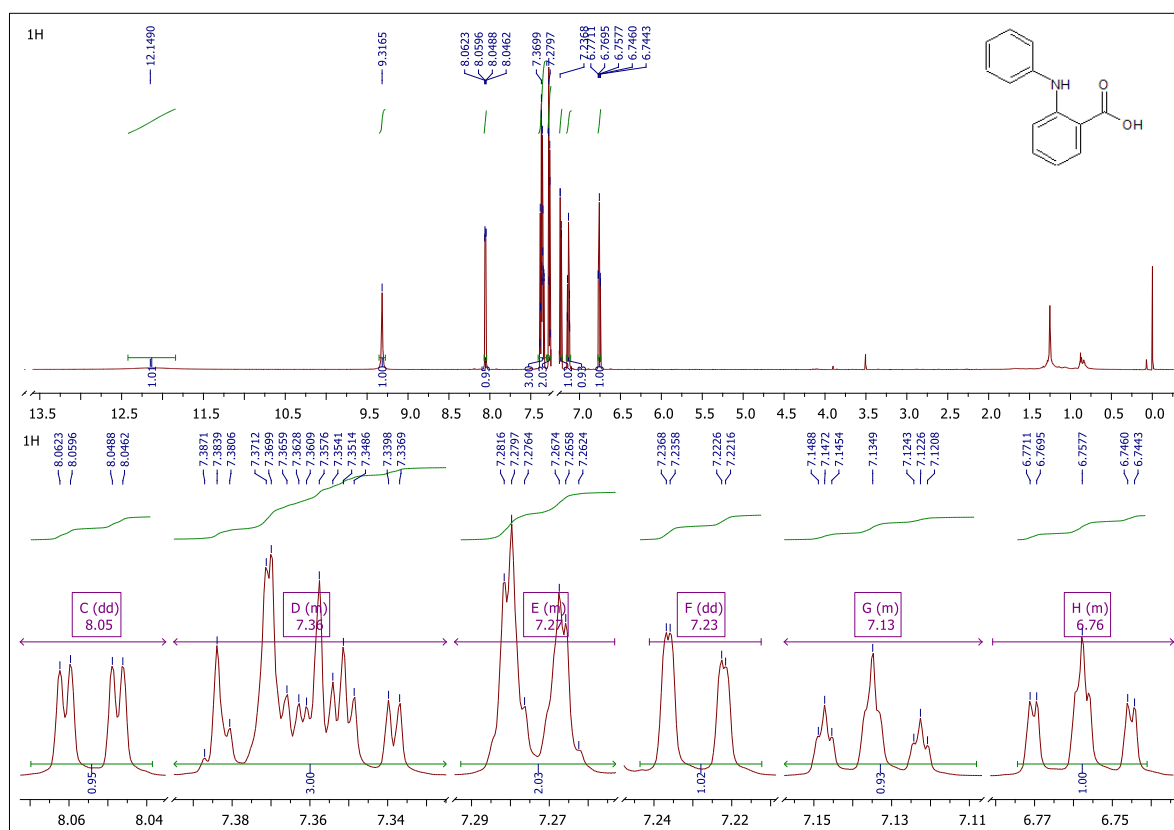


Imagen 33. Espectro de ¹H RMN de la molécula **4**, en la parte superior se muestra el espectro completo, en la parte inferior se muestra las señales representativas ampliadas.

Como se muestra en la Imagen 33, el espectro de la molécula **4** presenta un total de 9 señales que integran para un total de 11 protones, correspondiendo con los protones presentes en esta molécula. Las señales correspondientes a los protones de los anillos aromáticos se encuentran en un rango de 6.74–8.05 ppm, estas señales corresponden al desplazamiento químico reportado para este tipo de protones; de igual manera, se puede observar una señal única en forma de singulete con desplazamiento químico de 9.32 ppm, esta señal corresponde al protón del grupo amino. El protón del ácido carboxílico presenta una señal un tanto aplanada, esto debido a la desprotección que presenta este protón al estar unido al oxígeno, esta señal se encuentra en 12.15 ppm, lo que corresponde al desplazamiento químico reportado para este tipo de protones (Laurella S., 2017).

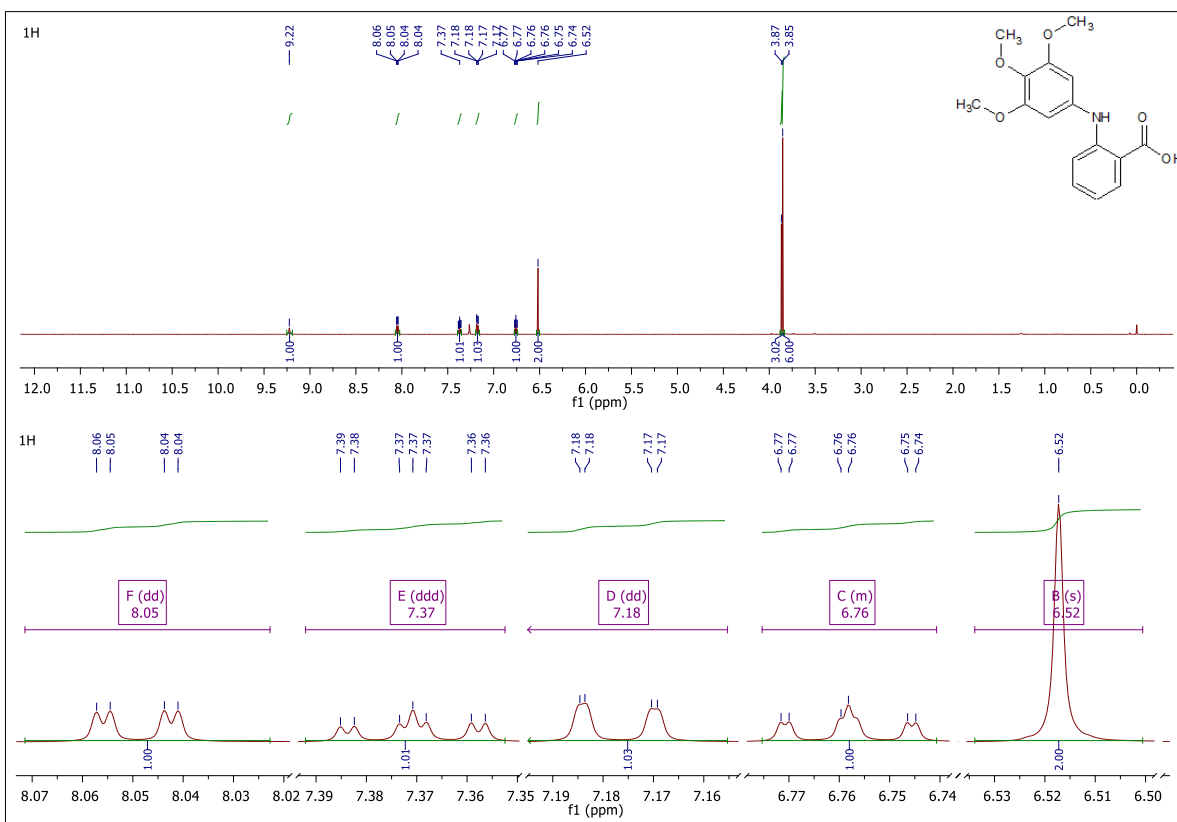
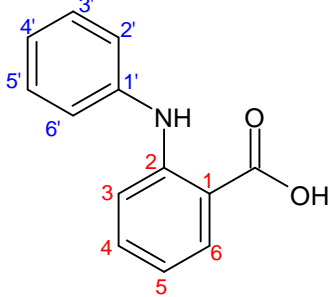
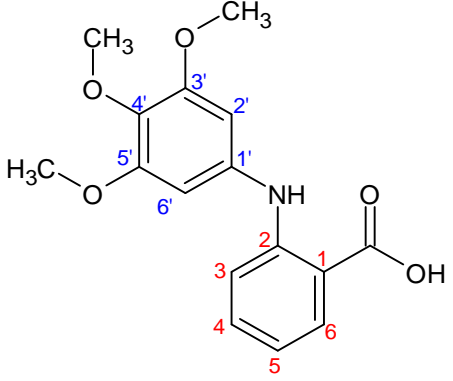


Imagen 34. Espectro de ¹H RMN de la molécula **5**, en la parte superior se muestra el espectro completo, en la parte inferior se muestra las señales representativas ampliadas.

En la Imagen 34 se puede observar el espectro correspondiente a la molécula **5**, se observan 7 señales que integran para 16 protones, esto corresponde a los protones presentes en esta molécula, sin embargo, como ya se mencionó, la señal del protón del ácido carboxílico no es observada. Las señales correspondientes a los protones de los anillos aromáticos se encuentran entre 6.52 y 8.05 ppm, señales encontradas en un rango reportado para este tipo de protones; en esta molécula están presentes protones de los grupos metoxilo, estos protones presentan un desplazamiento químico de 3.85 y 3.87 ppm y dos señales en forma de singuletes que integran para 6 y 3 protones respectivamente. Por último, se presenta una señal en forma de singulete con desplazamiento químico de 9.22 ppm, esta señal corresponde al grupo amino de la molécula (Laurella S., 2017).

Tabla 26. Señales características de ^{13}C RMN de las moléculas **3** y **4** obtenidas en ppm

Estructura		
Carbono*	Molécula 4 (δ en ppm)	Molécula 5 (δ en ppm)
1'	140.28	136.15
2' y 6'	123.12	101.33
3' y 5'	129.43	153.75
4'	124.09	135.27
1	114.04	114.14
2	148.89	149.37
3	110.35	110.07
4	135.23	134.94
5	117.17	116.96
6	132.61	132.53
C=O	173.87	173.49
OCH ₃	N/A	56.14 (2 C), 61.04

*Señales asignadas tomando como referencia el espectro predicho en MestreNova

Al igual que en los espectros de protón, en el espectro de carbono se obtuvieron los desplazamientos químicos, estos dependen del tipo de carbono y de su ambiente químico. En la tabla 26 se puede mostrar que los carbonos 1-6 presentan desplazamientos químicos similares en ambas moléculas, esto indica la presencia del ácido benzoico en ambos espectros; además de esto, el carbono carbonílico muestra un desplazamiento químico similar en ambas moléculas, por lo que también se identifica la presencia de este grupo, por otro lado, se puede observar que la molécula **4**, no presenta las señales características para los carbonos del metoxilo, esto nos indica la diferencia entre las dos estructuras, además, los carbonos 3'-5' presentan desplazamientos químicos diferentes entre las dos moléculas, esto explica la presencia de sustituyentes en la molécula **5**, en este caso los grupos

metoxilo. Esta información permite diferenciar los espectros de las dos moléculas, identificando carbonos químicamente diferentes en las moléculas sintetizadas (Imagen 35 y 36).

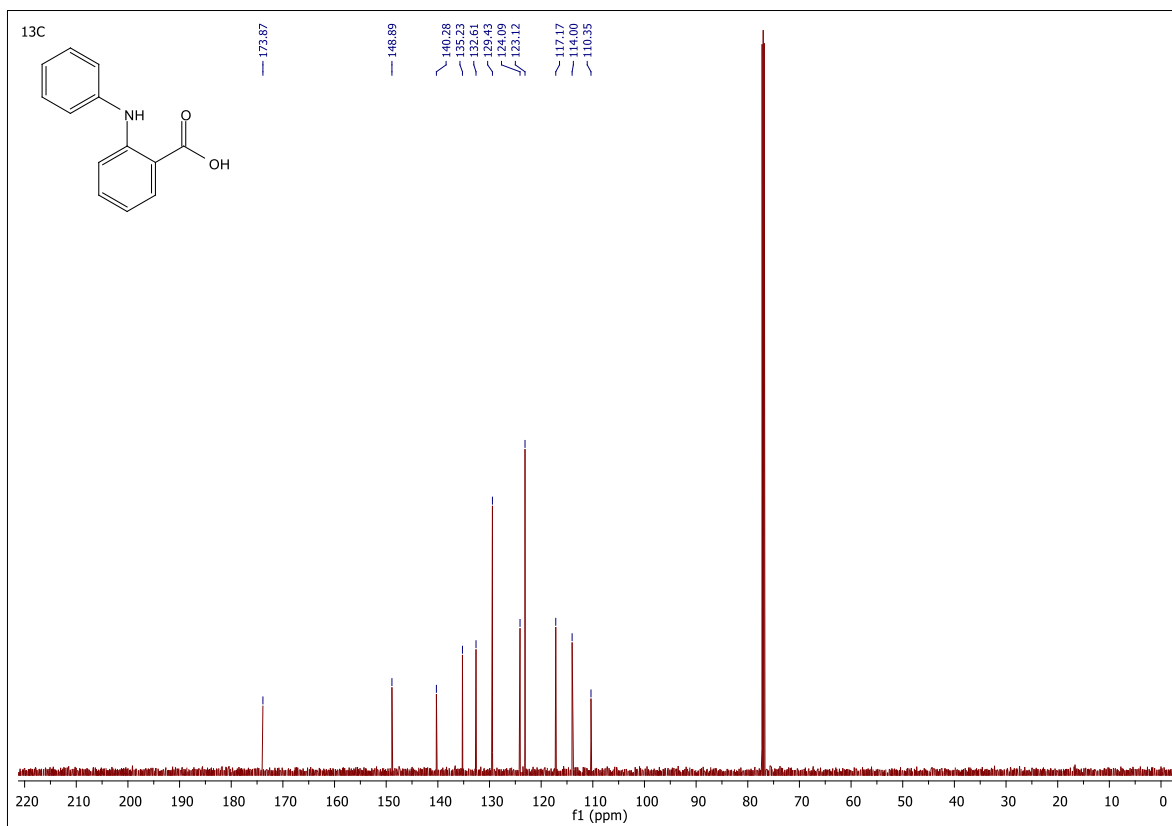


Imagen 35. Espectro de ^{13}C RMN de la molécula **4**.

La Imagen 35 muestra las señales obtenidas en el espectro de ^{13}C RMN de la molécula **4**, en la parte superior se observa el espectro completo, se pueden observar las diferentes señales obtenidas para esta molécula, en la parte inferior se muestran las señales ampliadas, se presentan once picos que corresponden a trece carbonos presentes en la molécula **4**. Se puede observar que los carbonos aromáticos presentan un desplazamiento químico de 110-148 ppm, esto coincide con los desplazamientos reportados para los carbonos aromáticos, de igual manera, se pueden observar dos señales más amplias, correspondientes a los carbonos químicamente idénticos 2' y 6', y 3' y 5'. La señal para el carbono del carbonilo presenta un desplazamiento químico de 173.87 ppm, que, de igual manera, coincide con los desplazamientos químicos descritos para este tipo de carbonos. Esta

información permite determinar que las señales identificadas en el espectro de ^{13}C RMN de la molécula **4**, coinciden con los carbonos presentes en la molécula sintetizada (Laurella S., 2017).

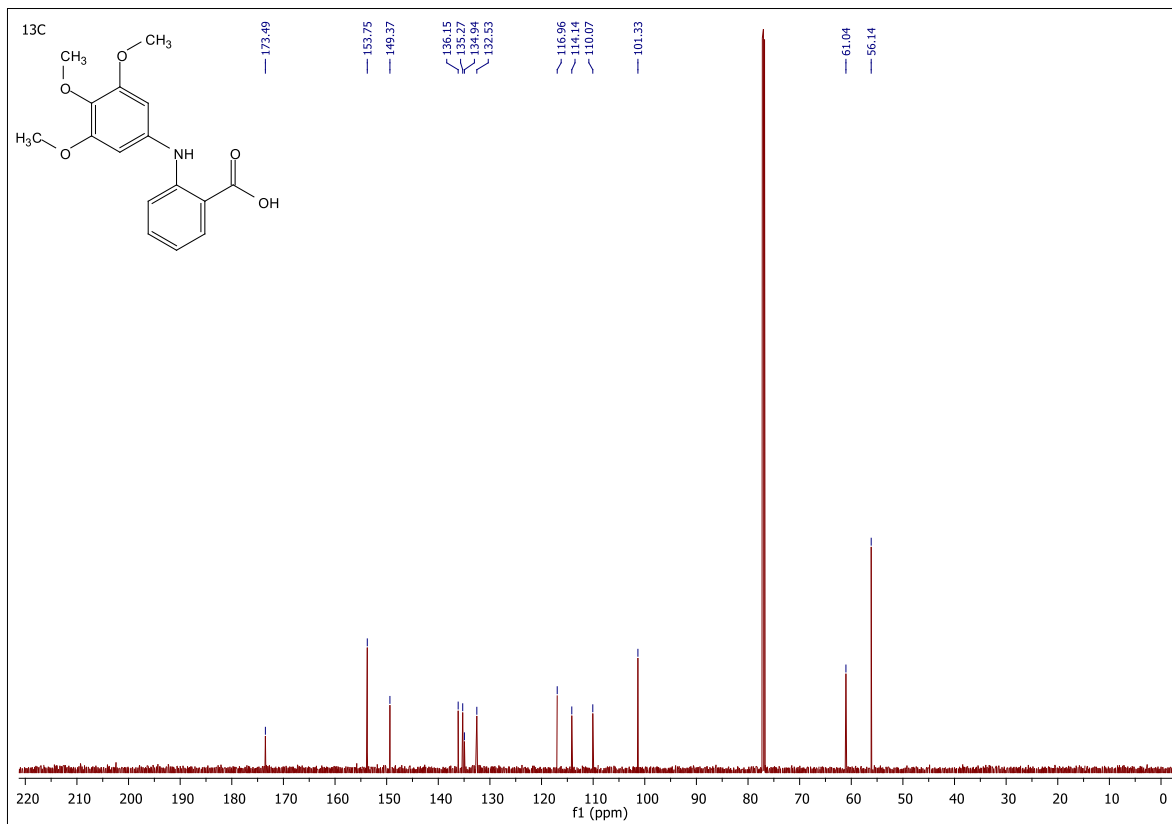
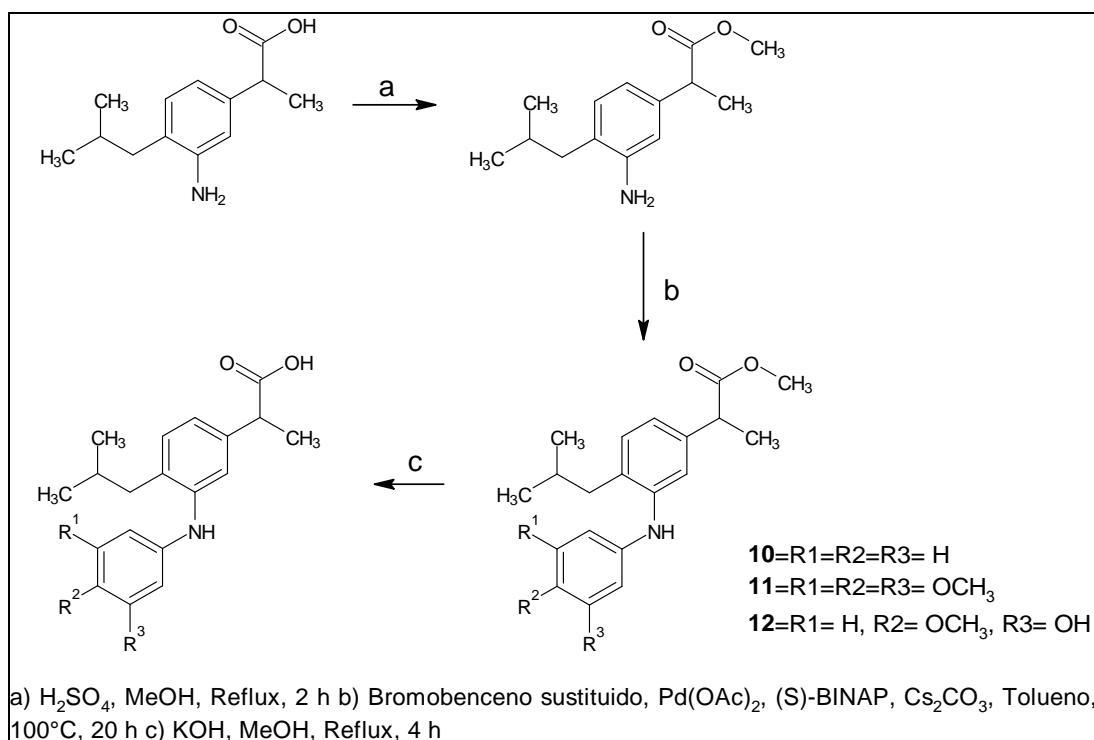


Imagen 36. Espectro de ^{13}C RMN de la molécula **5**.

En la Imagen 36 se muestran las señales características del espectro de ^{13}C RMN para la molécula **5**, como se observa, se obtuvieron trece señales que corresponden a dieciséis carbonos presentes en esta molécula, todas las señales se presentan en señales únicas, siendo las señales 56.14, 101.33 y 153.75 ppm las correspondientes para dos carbonos, la señal de 56.14 ppm corresponde a dos carbonos químicamente idénticos de los grupos metoxilo, el otro carbono del metoxilo presenta un desplazamiento químico de 61.04 ppm; los carbonos de los anillos aromáticos presentan un desplazamiento químico entre 101.33–153.75 ppm, de igual manera, coinciden con los desplazamientos químicos reportados para este tipo de átomos; por último, el carbono del carbonilo presenta un desplazamiento de 173.49 ppm, apareciendo la señal en el rango identificado para este tipo de

carbonos. Esta información permite determinar que las señales obtenidas en el espectro de ^{13}C RMN de la molécula **5** pertenecen a los átomos de carbono presentes en la molécula sintetizada (Laurella S., 2017).

Como se mencionó, el desplazamiento químico obtenido en los espectros de RNM indica la presencia de los átomos de carbono y protón de las moléculas **4** y **5**, con esta información se permite determinar que las moléculas sintetizadas corresponden a las estructuras propuestas, por lo tanto, la exitosa síntesis de estas moléculas permite identificar una potencial ruta de síntesis para los derivados de ibuprofeno **10–12**. La ruta de síntesis propuesta para los derivados de ibuprofeno se muestra en el Esquema 4, al igual que en la ruta de síntesis de las moléculas **4** y **5**, en la primera etapa se lleva a cabo una esterificación de Fischer, en la segunda un acoplamiento C-N de Wolfe y Bushwald y, por último, una hidrólisis básica del éster.



Esquema 4. Ruta de síntesis propuesta para los derivados de ibuprofeno **10–12**

9. Conclusiones

Se logró identificar que los blancos moleculares objetivo de los fármacos cabeza de serie CA-4, celecoxib, ácido mefenámico, diclofenaco, ibuprofeno e indometacina, están relacionados con cáncer de manera directa o indirecta, los blancos moleculares identificados son: tubulina, AKR1C3, COX-1 y COX-2, además, por medio de métodos computacionales, se identificó la probabilidad de unión de los derivados híbridos **1–15** sobre estos, permitiendo así la selección de dichos blancos para estudios de acoplamiento molecular.

Por otro lado, con la ayuda de plataformas en línea, se obtuvieron predicciones de las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas para los derivados híbridos propuestos, en general, ninguna de las moléculas evaluadas presentó alertas que indicaran un futuro no exitoso para su diseño como candidatos a fármacos.

Los estudios de acoplamiento molecular relevaron información trascendental; y permitieron proponer que las moléculas **10–12** son las que presentan mejor afinidad por el sitio de colchicina en la tubulina, esto se determinó gracias a las energías de unión obtenidas por estas moléculas, y, por el análisis de interacciones encontradas en el cálculo de acoplamiento. Además, se seleccionaron las moléculas **10–12** para el análisis del acoplamiento con los otros blancos identificados (AKR1C3, COX-1 y COX-2). Los resultados permitieron identificar una posible afinidad sobre estos blancos, esto se debe a que se obtuvieron energías de unión similares a las encontradas con los ligandos cristalizados, además de presentar gran parte de las interacciones necesarias para ejercer un efecto farmacológico sobre estos blancos, por lo que, se sugiere que estas moléculas podrían ejercer un efecto polifarmacológico y, presentar una alta actividad citotóxica en estudios *in vitro*. Sin embargo, se pudo identificar que las moléculas restantes **1–9** y **13–15** también pudieran presentar, en menor medida, afinidad por los blancos estudiados, esto es de gran importancia ya que, posteriormente se puede trabajar con la evaluación biológica *in vitro* de estos derivados y corroborar los resultados de los estudios de acoplamiento molecular realizados.

De igual manera, se seleccionaron los híbridos **10–12** para el análisis del acoplamiento molecular en los sitios alternativos de unión a la tubulina y se logró identificar que estos compuestos podrían presentar afinidad por el sitio del taxano, sin embargo, según los estudios de acoplamiento, esta afinidad podría ser menor que la presentada en el sitio de colchicina, esto se debe a que en el sitio de taxano, los híbridos presentaron menores energías de unión, así como una menor cantidad de interacciones reportadas para ejercer un efecto farmacológico, por lo que, se determinó que las moléculas **10–12** tienen mayor probabilidad de unirse al sitio de la colchicina en tubulina y, por lo tanto, provocar una desestabilización de los microtúbulos y una muerte celular.

Por último, se lograron sintetizar las moléculas **4** y **5** en buenos rendimientos con la metodología propuesta, y se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojo y por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . Esto permite proponer que se puede emplear la misma estrategia de síntesis para obtener los derivados híbridos de ibuprofeno **10–12**, mismos que presentan una mayor probabilidad de ejercer un efecto citotóxico según los estudios computacionales.

La información obtenida en este trabajo de investigación es de gran relevancia para estudios posteriores. Los resultados obtenidos indican el potencial que tienen estas moléculas para ser candidatos a fármacos, por lo tanto, se recomienda la continuación en los estudios de estas moléculas, particularmente, la síntesis de los candidatos **10–12** para su evaluación *in vitro* y, en caso de éxito, su posterior evaluación *in vivo*.

10. Referencias

1. Ali J., C. P. (2012). In Silico Prediction of Aqueous Solubility Using Simple QSPR Models: The Importance of Phenol and Phenol-like Moieties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2950-2957.
2. Aller S., Y. J. (2009). Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*, 1718-1722.
3. Bael J., H. G. (2010). New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2719-2740.
4. Baguley B. (2002). A brief history of cancer chemotherapy. En B. B., *Anticancer drugs development* (págs. 1-11). Auckland, New Zealand: Academic Press.
5. Balaguer F., M. T. (2019). Crystal Structure of the Cyclostreptin-Tubulin Adduct: Implications for Tubulin Activation by Taxane-Site Ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-17.
6. Bañuelos A., M. J. (2014). Studies of (-)-Pironetin Binding to α -Tubulin: Conformation, Docking, and Molecular Dynamics. *The Journal of Organic Chemistry*, 3752-3764.
7. Benavides F., G. J. (2003). Las mutaciones. En G. J. Benavides F., *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones* (págs. 201-227). Madrid, España: SECAL.
8. Bian L. (2003). Proton Donor Is More Important Than Proton Acceptor in Hydrogen Bond Formation: A Universal Equation for Calculation of Hydrogen Bond Strength. *The Journal of Physical Chemistry*, 11517-11524.
9. Brenk R., S. A. (2008). Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. *ChemMedChem*, 435-444.
10. Brouhard G., R. L. (2018). Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews*, 1-13.
11. Brown F. (1998). Chemoinformatics: What is it and How does it Impact Drug Discovery. *Annu. Rep. Med. Chem.*, 375-384.
12. Chen W. (2006). Chemoinformatics: Past, Present, and Future. *J. Chem. Inf. Model.*, 2230-2255.
13. Cheng T., Z. Y. (2007). Computation of Octanol-Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2140-2148.

14. Cullen M., S. T. (2008). Inhibition of tubulin polymerization by select alkenyldiarylmethanes. *Bioorg Med Chem Lett* , 469-473.
15. Daina A., M. O. (2014). iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach . *Journal of Chemical Information and Modeling*, 3284-3301.
16. Daina A., M. O. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* , 1-13.
17. Daina A., M. O. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research* , 357-364.
18. Delaney, J. (2004). ESOL: estimating aqueous solubility directly from molecular structure. *Chemical Information and Computer Sciences* , 1000-1005.
19. DeVita V., C. E. (2008). A history of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, 8643-8653.
20. Dong L., Y. C. (2016). Fatty Acid Binding to the Allosteric Subunit of Cyclooxygenase-2 Relieves a Tonic Inhibition of the Catalytic Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 25641-25656.
21. DrugBank. (06 de enero de 2021). *Celecoxib*. Obtenido de <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00482>
22. Dumontet C., J. M. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature*, 790-803.
23. Egan W., M. K. (2000). Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 3867-3877.
24. El Sayed M., E.-S. M.-A. (2018). Design, synthesis, anti-inflammatory antitumor activities, molecular modeling and molecular dynamics simulations of potential naprosyn analogs as COX-1 and/or COX-2 inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 188-201.
25. Engel T. (2006). Basic Overview of Chemoinformatics. *Journal of Chemical Information and modeling*, 2267-2277.
26. Fan H., S.-D. D. (2011). Statistical Potential for Modeling and Ranking of Protein–Ligand Interactions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 3078-3092.

27. Filimonov D., L. A. (2014). Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chemistry of Heterocyclic Compound*, 444-457.
28. Fischer E., S. A. (1895). Darstellung der Ester. *Chemische Berichte*, 3252-3258.
29. Flanagan J., Y. Y. (2012). Crystal Structures of Three Classes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Complex with Aldo-Keto Reductase 1C3. *PLOS ONE*, 1-16.
30. Gaspari R., P. A. (2017). Structural Basis of cis- and trans-Combretastatin Binding to Tubulin. *Chem*, 102-113.
31. Gasteiger J. (2003). *Handbook of Chemoinformatics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
32. Ghose A., V. V. (1999). A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 55-68.
33. González R. (2002). El citocromo 1A2 (CYP1A2) en una población universitaria de Costa Rica. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 25-31.
34. Guengerich F. (2008). Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 70-83.
35. Gujar M., W. R. (2007). Synthesis and evaluation of 4/5-hydroxy-2,3-diaryl(substituted)-cyclopent-2-en-1-ones as cis-restricted analogues of combretastatin A-4 as novel anticancer agents. *J Med Chem*, 1744-1753.
36. Harris R., K. S. (1999). Prospective study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer. *Oncology reports*, 71-73.
37. Heldman A, C. L. (2001). Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation*, 2289-2295.
38. Herráez A. (2012). Bases moleculares del cáncer. En A. Herráez, *Texto ilustrativo de biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la Salud* (págs. 449-479). Madrid, España: ELSEVIER.
39. Hollingsworth S., D. R. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 1129-1143.

40. INSST. (5 de Enero de 2021). *Efectos sobre la salud de los agentes químicos*. Obtenido de <https://saludlaboralydiscapacidad.org/disciplinas-preventivas/higiene-industrial/quimicos/>
41. Islam M., I. M. (2004). Microtubulin Binding Sites as Target for Developing Anticancer Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 1077-1104.
42. Jia C., L. J. (2019). A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 1-15.
43. Johnson E., A. J. (1963). The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents . *Cancer Res.*, 1390-1427.
44. Jones G., W. P. (1997). Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of Molecular Biology* , 727-748.
45. Kanakkanthara A., R. M.-S. (2015). Betal-tubulin mutations in the laulimalide/peloruside binding site mediate drug sensitivity by altering drug–tubulin interactions and microtubule stability. *Cancer Letters*, 251-260.
46. Kishore P., P. R.-J. (2017). Molecular Basis of Binding Interactions of NSAIDs and Computer-Aided Drug Design Approaches in the Pursuit of the Development of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Selective Inhibitors. En A. G. Alkaf, *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Saná, Yemen.: IntechOpen.
47. Kitchen D. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drugs Discovery*, 935-949.
48. Kumar S., M. S. (2013). Novel indole-bearing combretastatin analogues as tubulin polymerization inhibitors. *Org Med Chem Lett* .
49. Lanisnik T., P. T. (2019). Aldo-keto reductase 1C3 – assessment as a new target for the treatment of endometriosis. *Pharmacological Research*, 1-49.
50. Laurella S. (2017). *Resonancia magnética nuclear: Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
51. Leach A., G. V. (2007). *An introduction to chemoinformatics*. Stevenage, Reino Unido: Springer.
52. Lipinski C., L. F. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3-25.
53. Liu Y., H. S. (2020). Overview of AKR1C3: Inhibitor Achievements and Disease Insights. *Journal of medicinal chemistry*, 1-91.

54. Lovering F., B. J. (2009). Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *Journal of Medicinal Chemistry*, 6752-6756.
55. Löwe J., L. H. (2001). Refined Structure of α -Tubulin at 3.5 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1045-1057.
56. Lozada M., S. O. (2013). *Espectroscopía de infrarrojo, conceptos y problemas*. Ciudad de México, México: Universidad Autónoma Metropolitana: Unidad Xochimilco.
57. Lozano G., M. d. (1998). MDM2 function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 55-59.
58. Lu Y., C. X. (2012). An overview of tubuline inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharma Res*, 2943-2971.
59. Lugones M., R. M. (2009). Aspectos históricos y culturales sobre el cáncer de mama. *Revista Cubana de Medicina General Integral.*, 160-166.
60. Maman S., W. I. (2018). A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews*, 359-376.
61. Martin Y. (2005). A Bioavailability Score. *Journal of Medicinal Chemistry*, 3164-3170.
62. Mbonye U., Y. C. (2008). Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *Biol. Chem.*, 8611–8623.
63. McGown A, F. B. (1989). Structural and biochemical comparison of the anti-mitotic agents colchicine, combretastatin A4 and amphethinile. *Anticancer Drug Des*, 249-254.
64. Medina J. (2006). Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación química*, 452-457.
65. Medina J. (2015). Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 1-7.
66. Meng X., Z. H. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 146-157.
67. Mollinedo F., G. C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*, 413-450.
68. Moriguchi I., H. S. (1994). Comparison of Reliability of log P Values for Drugs Calculated by Several Methods. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 976-978.

69. Muegge I., H. S. (2001). Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1841-1846.
70. NCBI. (25 de noviembre de 2018). *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database*. Obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5351344>
71. NCI. (29 de 04 de 2015). *Chemotherapy to Treat Cancer*. Obtenido de <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>
72. Neukom J., A. A. (2011). Synthesis of Saturated 1,4-Benzodiazepines via Pd-Catalyzed Carboamination Reactions. *Organic Letters*, 2196-2199.
73. Nguyen H., T. Y. (2019). Design, Synthesis and Biological Activities of New Pyrazole Derivatives Possessing Both Coxib and Combretastatins Pharmacophores. *Chemistry & Biodiversity*, 1-9.
74. Nguyen T., T. Y. (2019). Design, Synthesis and Biological Activities of New Pyrazole Derivatives Possessing Both Coxib and Combretastatins Pharmacophores. *Chemistry and Biodiversity*, 1-9.
75. NIH. (1990-2003). *The Human Genome Project*.
76. Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*, 277-302.
77. Novikov F., C. G. (2009). Molecular docking: theoretical background, practical applications and perspectives. *Mendeleev Communications*, 237-242.
78. OMS. (12 de 10 de 2018). *Organización mundial de la salud*. Obtenido de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
79. Organic Chemistry Portal. (08 de Enero de 2021). *LogS calculation*. Obtenido de Organic Chemistry Portal: <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/logS.html>
80. Orlando B., M. M. (2016). Substrate Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives is Dependent on Peroxide Tone. *Journal of Biological Chemistry*, 1-18.
81. Page R., y. T. (2011). Principles of chemotherapy. En P. R., *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach, Medical, Surgical, and Radiation Oncology* (págs. 21-37). UBM Medica.
82. Pajouhesh H., L. G. (2005). Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX*, 541-553.
83. Pannuziuo A., C. M. (2018). Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 Inhibitors in Cancer: A Review of Oncology and Medicinal Chemistry Literature. *Pharmaceuticals*, 1-20.

84. Pettit G., R. M. (2005). Antineoplastic agents. 445. Synthesis and evaluation of structural modifications of (Z)- and (E)-combretastatin A-41. *J Med Chem*, 4087-4099.
85. Pliska V., T. B. (1996). *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. Alemania: VCH.
86. POC. (11 de enero de 2021). *OSIRIS Property Explorer*. Obtenido de <https://www.organic-chemistry.org/prog/peol/>
87. Protá A. (2014). A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 13817-13821.
88. Protá A. (2016). Pironetin Binds Covalently to α Cys316 and Perturbs a Major Loop and Helix of α -Tubulin to Inhibit Microtubule Formation. *Journal of Molecular biology*, 2981-2988.
89. PubChem. (06 de enero de 2021). *Celecoxib (compound)*. Obtenido de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2662>
90. PubChem. (06 de enero de 2021). *Diclofenac (compound)*. Obtenido de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033>
91. PubChem. (06 de enero de 2021). *Ibuprofen (compound)*. Obtenido de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672>
92. PubChem. (06 de enero de 2021). *Indometacin (compound)*. Obtenido de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3715>
93. PubChem. (06 de enero de 2021). *Mefenamic acid (compound)*. Obtenido de PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4044>
94. Ravelli R., G. B. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* , 198-202.
95. Reddy A., R. K. (2017). Copper(II)-catalyzed Chan–Lam cross-coupling: chemoselective N-arylation of aminophenols. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 801-806.
96. Rimon G., S. R. (2010). Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *PNAS*, 28-33.
97. Roca C. (2018). *Técnicas computacionales aplicadas al descubrimiento de neurofármacos*. Madrid, España.
98. Rouzer C., M. L. (2009). Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*, 29-34.

99. Saldivar F., P. F. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 51-58.
100. Salvo E., C. A. (2015). Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 686-696.
101. Schneide G., F. U. (2005). Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews Drug Discovery*, 649-663.
102. Selinsky B., G. K. (2001). Structural Analysis of NSAID Binding by Prostaglandin H2 Synthase: Time-Dependent and Time-Independent Inhibitors Elicit Identical Enzyme Conformations. *Biochemistry*, 5172-5180.
103. Sharma V., S. A. (2003). Novel 6,7-diphenyl-2,3,8,8a-tetrahydro-1H-indolizin-5-one analogues as cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 1679-1682.
104. Silicos-it. (20 de Septiembre de 2012). *Filter-it*. Obtenido de <http://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html>
105. Smith W., D. D. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem*, 145-182.
106. Sobolewski C., C. C. (2010). The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology 2010*.
107. Soriano A. (2015). Anti-inflammatory drugs and uterine cervical cancer cells: Antineoplastic effect of meclofenamic acid. *Oncology Letters*, 2574-2578.
108. SS. (08 de agosto de 2017). *Gobierno de México*. Obtenido de <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
109. Steinmetz M., P. A. (2018). Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 1-17.
110. Teague S., D. A. (1999). The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. *Angewandte Chemie*, 3743-3748.
111. Theodorou V., S. K. (2007). A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, 8230-8233.
112. Thun M., H. S. (2007). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues. *Journal of the National Cancer Institute*, 252-266.

113. Trigili C. (2013). *Estudio y caracterización del mecanismo de acción bioquímico y celular de compuestos antitumorales dirigidos contra el citoesqueleto*. Madrid.
114. Tron G., P. T. (2006). Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J Med Chem*, 3033-3044.
115. Trott O., O. A. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 455-461.
116. Tsujii M., K. S. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*(93), 705-16.
117. Ullman F. (1903). Ueber eine neue Bildungsweise von Diphenylaminderivaten. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 2382-2384.
118. UniProt. (25 de 11 de 2020). *UniProtKB*. Obtenido de <http://uniprot.org>
119. Veber D., J. S. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* , 2615-2623.
120. Vlachakis D. (2018). Introductory Chapter: Molecular Docking - Overview, Background, Application and What the Future Holds. En D. Vlachakis, *Molecular Docking* (págs. 3-9). Atenas, Grecia: IntechOpen.
121. Volker S. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 407-419.
122. Wang J. (2011). Recent Advances on Aqueous Solubility Prediction. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 328-338.
123. Wang J., L. D. (2010). The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7159-7163.
124. Warren G., A. C. (2006). A critical assessment of docking programs and scoring functions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 5912-5931.
125. Watkins P. (1994). Noninvasive test of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics*, 171-184.
126. WHO. (2001). *Principles For Evaluating Health Risks To Reproduction Associated With Exposure To Chemicals*. Ginebra, Suiza.

127. Wildman S., C. G. (1999). Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 868-873.
128. Williams C., M. M. (2006). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 7908-7916.
129. Wolfe P., W. S. (1998). A highly active palladium catalyst system for the arylation of anilines. *Tetrahedron Letters*, 5327-5330.
130. Yang J., W. Y. (2016). Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nature* , 1-9.

11. Anexos

ANEXO I

Parámetros para los cálculos de acoplamiento molecular

Sitio de colchicina en α/β -Tubulina

Parámetro	AutoDock Vina	AutoDock 4.2	GOLD
Coordenadas	x= 16.615 y= 64.774 z= 42.127	x= 16.615 y= 64.774 z= 42.127	Determinadas por ligando cristalizado
Tamaño GridBox	x= 20 y= 16 z= 32	x= 30 y= 30 z= 40	Determinado por ligando cristalizado
Exhaustividad	250	Media	Media

AKR1C3

Parámetro	AutoDock Vina	AutoDock 4.2	GOLD
Coordenadas	x= -1.954 y= 7.413 z= 14.347	x= -1.954 y= 7.413 z= 14.347	Determinadas por ligando cristalizado
Tamaño GridBox	x= 20 y= 26 z= 12	x= 30 y= 30 z= 40	Determinado por ligando cristalizado
Exhaustividad	250	Media	Media

COX-1

Parámetro	AutoDock Vina	AutoDock 4.2	GOLD
Coordenadas	x= -32.472 y= 43.667 z= -6.186	x= -32.472 y= 43.667 z= -6.186	Determinadas por ligando cristalizado
Tamaño GridBox	x= 16 y= 28 z= 32	x= 16 y= 28 z= 32	Determinado por ligando cristalizado
Exhaustividad	250	Media	Media

COX-2

Parámetro	AutoDock Vina	AutoDock 4.2	GOLD
Coordenadas	x= 38.041 y= 2.769 z= 60.678	x= 38.041 y= 2.769 z= 60.678	Determinadas por ligando cristalizado
Tamaño GridBox	x= 22 y= 18 z= 28	x= 22 y= 18 z= 28	Determinado por ligando cristalizado
Exhaustividad	250	Media	Media

Sitio de Laulimalida en β -Tubulina, archivo PDB 4O4I

Parámetro	AutoDock Vina
Coordenadas	x= -0.283, y= 53.618, z= 45.562
Tamaño GridBox	x= 36, y= 36, z= 36
Exhaustividad	250

Sitio de Maitansina en β -Tubulina, archivo PDB 6FII

Parámetro	AutoDock Vina
Coordenadas	x= 10.317, y= 30.181, z= 17.96
Tamaño GridBox	x= 56, y= 56, z= 56
Exhaustividad	250

Sitio de Pironetina en α -Tubulina, archivo PDB 5LA6

Parámetro	AutoDock Vina
Coordenadas	x= 28.995, y= 89.689, z= 68.441
Tamaño GridBox	x= 36, y= 36, z= 36
Exhaustividad	250

Sitio del Taxano en β -Tubulina, archivo PDB 6QTN

Parámetro	AutoDock Vina
Coordenadas	x= -2.618, y= 60.509, z= 24.479
Tamaño GridBox	x= 36, y= 36, z= 36
Exhaustividad	250

Sitio de los alcaloides de la vinca en β -Tubulina, archivo PDB 4EB6

Parámetro	AutoDock Vina
Coordenadas	x= 1.936, y= 40.423, z= 17.548
Tamaño GridBox	x= 46, y= 46, z= 46
Exhaustividad	250

ANEXO II

Síntesis de las moléculas 4 y 5

Molécula 1b (2-bromobenzoato de metilo)

En un matraz bola se agregó 0.202 mmol de ácido 2-bromobenzoico, posteriormente se agregaron 3 mL de una solución al 5% p/p de H₂SO₄/MeOH, el matraz se colocó en un baño de aceite a reflujo y en agitación durante 2 horas. Al terminar la reacción, se agregaron 10 mL de agua a la mezcla de reacción, se realizó extracción con acetato de etilo 3x10 mL, la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄, la fase orgánica fue secada al vacío hasta obtener un producto con apariencia aceitosa.

Moléculas 4a (2-anilinobenzoato de metilo) y 5a (2-(3,4,5-trimetoxianilino) benzoato de metilo)

Se cargó un matraz bola con una barra magnética y un septum previamente secados en una estufa, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se purgó con N₂, se adicionaron 0.0321 mmol de Pd(OAc)₂ y 0.038 mmol de (S)-BINAP, se colocó el septum y se purgó durante 5 minutos con N₂, se agregaron 1.5 mL de tolueno anhidro y se comenzó la agitación durante 5 minutos. Se agregó al matraz 1.07 mmol de 2-bromobenzoato de metilo y 1.29 mmol de la anilina correspondiente, posteriormente se agregó 1.5 mmol de CsCO₃ bajo flujo de N₂ a la mezcla de reacción, se adicionaron 1.5 mL de tolueno anhidro, se colocó el matraz en baño de aceite a 100°C durante 20 horas. Al término de la reacción, se agregaron 20 mL de solución salina saturada y 5 mL de agua destilada, se realizó extracción con acetato de etilo 3x10 mL, la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ y secada al vacío hasta obtener un sólido negro, posteriormente se realizó columna cromatográfica utilizando fase móvil Hexano-Acetato de etilo (8:2) para obtener el producto purificado con apariencia aceitosa.

Moléculas 4 (ácido-2-anilinobenzoico) y 5 (ácido-2-(3,4,5-trimetoxianilino) benzoico)

En un matraz bola se añadieron 0.57 mmol de **4a** o **5a** según sea el caso, 7 mL de MeOH y posteriormente 2.5 mL de una solución acuosa de KOH 0.8 M, se colocó

en un baño de aceite a reflujo y con agitación constante durante 4 horas. Al término de la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente la mezcla se colocó en un baño de hielo y se llevó a pH 1 agregando HCl concentrado, el precipitado obtenido fue filtrado al vacío, lavado con solución acuosa de HCl, hasta obtener un sólido blanquecino.

ANEXO III

Espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN

