



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO, OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE FÁRMACOS Y BIOMOLÉCULAS

**“ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y SÍNTESIS DE DERIVADOS INDAZÓLICOS COMO
POTENCIALES AGENTES CITOTÓXICOS INHIBIDORES DE TUBULINA”**

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

PRESENTA

Q.F.B Antonio Medrano González
2213803100

COMITÉ TUTORAL

Tutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Asesor: Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez

Asesor: Dr. Juan Francisco Cortés Benítez

Diciembre, 2024

**“ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y SÍNTESIS DE DERIVADOS INDAZÓLICOS COMO
POTENCIALES AGENTES CITOTÓXICOS INHIBIDORES DE TUBULINA”**

Vo.Bo. del Comité tutorial

Tutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva



Asesor: Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez



Asesor: Dr. Juan Francisco Cortés Benítez



Alumno




Q.F.B. Antonio Medrano González

2213803100

**“ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y SÍNTESIS DE DERIVADOS INDAZÓLICOS COMO
POTENCIALES AGENTES CITOTÓXICOS INHIBIDORES DE TUBULINA”**

Jurado



Presidente
Dr. Marco Antonio Loza Mejía



Vocal
Dra. Sandra Mendoza Elizalde



Secretario
Dr. Jaime Pérez Villanueva

“Lo que más amo de la ciencia es que a medida que aprendes, realmente no obtienes respuestas, solo tienes mejores preguntas.”

John Green

Resumen

En las últimas décadas el cáncer se ha convertido en un grave problema de salud pública, debido a que es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, por lo que la detección, tratamiento e investigación cobran relevancia en el marco actual. Hoy en día existen diversos tipos de tratamiento, dentro de los cuales se encuentra la cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia combinada y con láser; siendo la quimioterapia el recurso mayormente empleado.

Uno de los grandes retos que se presentan en la clínica con el uso de fármacos antimetabólicos, son los efectos adversos derivados de su uso, como son cardiotoxicidad, depresión del sistema inmune y en muchos casos disminución o pérdida de eficacia de la quimioterapia derivado de la quimioresistencia a múltiples fármacos, los cuales hacen que en muchos casos los riesgos de su empleo superen a los potenciales beneficios. Es por ello que existe una necesidad constante del desarrollo de nuevas moléculas que puedan ofrecer mejores condiciones terapéuticas a los ya disponibles.

En el presente trabajo se pretende estudiar cinco nuevas moléculas derivadas de 2,3-difenil-2H-indazol mediante estudios de acoplamiento molecular para determinar su afinidad sobre la interfaz α/β -tubulina, con ayuda de los softwares *AutoDock 4.2*, *AutoDock Vina* y *GOLD*. Las moléculas planteadas se sintetizaron de manera exitosa, las cuales fueron caracterizadas mediante resonancia magnética nuclear de ^1H .

Finalmente los compuestos fueron evaluados sobre dos líneas celulares (HeLa y SK-LU-1) para determinar su actividad anti proliferativa mediante el ensayo de sulforrodamida B. Dos de las cinco moléculas mostraron resultados prometedores, a las cuales se les determinó sus correspondientes concentraciones inhibitorias 50, siendo la molécula AMC2 la más destacable.

Agradecimientos Personales

A Dios por guiarme y estar a mi lado en todo momento.

A mis padres, que han hecho posible que soñaré como un niño y hacerme creer que todo es posible. Gracias por su cariño y siempre brindarme su apoyo incondicional, el cual me ha impulsado a perseguir mis metas y nunca desistir ante las adversidades. Me hacen sentir millonario.

A mi hermana por ser mi guía y compañera de aventuras que me acompaña y apoya en cada momento de mi vida, contigo aprendí que, el éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día tras día. La vida nunca hubiera sido igual sin ti.

A mi tutor el Dr. Jaime Pérez Villanueva, por creer en mi y brindarme un espacio en su laboratorio, de verdad que valoro mucho su apoyo y enseñanzas que me permitieron llegar a esta instancia tan anhelada. A mis asesores el Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez y el Dr. Juan Francisco Córtes Benítez; así mismo a la Dra. Karen Rodríguez Villar y el Dr. Juan Francisco Palacios Espinoza por todo el apoyo que me brindaron durante la realización de este proyecto y por enseñarme a analizar y cuestionarme todo. Sin su ayuda nada hubiera sido posible.

A mis amigos y compañeros de laboratorio con los cuales compartí muchas risas, buenos momentos y experiencias gratificantes que pasamos juntos. Gracias por su amistad, siempre los llevaré conmigo.

Agradecimientos Institucionales

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.

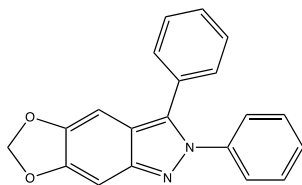
Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado para la realización del presente proyecto. CVU 1166637.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Cáncer	2
2.2 Tratamiento del cáncer	4
2.3 Indazoles	6
2.4 Diseño de fármacos asistido por computadora	7
2.5 Acoplamiento molecular	8
2.6 Tubulina como diana terapéutica	9
2.7 Dinámica de los microtúbulos	11
2.8 Agentes de unión a microtúbulos	12
3. ANTECEDENTES	17
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS	20
6.1 Objetivo general.....	20
6.2 Objetivos particulares	20
7. METODOLOGÍA.....	20
7.1 Diseño de derivados indazólicos	20
7.2 Predicción de las propiedades fisicoquímicas.....	21
7.3 Acoplamiento molecular dirigido	22
7.4 Síntesis.....	24
7.5 Materiales y equipos	25

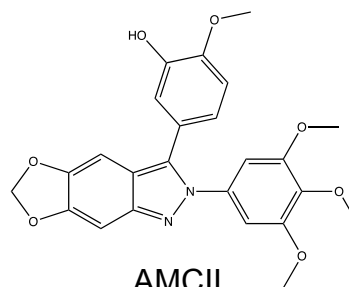
7.6 Evaluación de la actividad citotóxica	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
8.1 Síntesis de nuevos derivados	28
8.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	30
8.2 Predicción de propiedades fisicoquímicas	33
8.3 Acoplamiento molecular	34
8.4 Interacciones ligando-receptor	37
8.5 Evaluación de la actividad citotóxica	43
9. CONCLUSIONES.....	47
10. PERSPECTIVAS.....	48
11. REFERENCIAS.....	48
12. ANEXO I.....	55

Índice de compuestos sintetizados



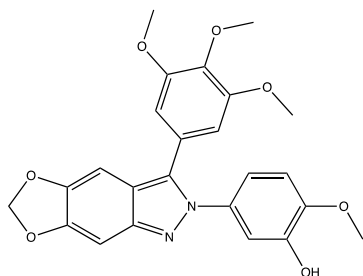
AMCI

2,3-difenil-2H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indazol



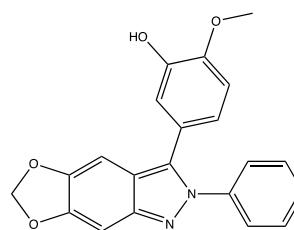
AMCII

2-metoxi-5-(2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indazol-3-il)fenol



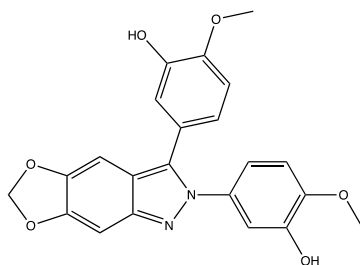
AMCIII

2-metoxi-5-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indazol-2-il)fenol



AMCIV

2-metoxi-5-(2-fenil-2H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indazol-3-il)fenol



AMCV

5'-(2H-[1,3]dioxolo[4,5-f]indazol-2,3-diil)bis(2-metoxifenol)

Lista de abreviaturas

AcOEt: Acetato de etilo

Br₂: Bromo

CDCl₃: Cloroformo deuterado

C₆H₁₄: Hexano

CH₃COOH: Ácido acético

CHCl₃: Cloroformo

(C₆H₅)₃P: Trifenilfosfina

Cl₅₀: Concentración inhibitoria 50

DMSO: Dimetilsulfóxido

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

Hz: Hertz

μM: micro Molar

NaCl: Cloruro de sodio

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

Na₂SO₄: Sulfato de sodio

P(OEt)₃: Fosfito de trietilo

Pd(AcO)₂: Acetato de paladio II

ppm: Partes por millón

RMN: Resonancia magnética nuclear

TCA: Ácido tricloroacético

TMS: Tetrametilsilano

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, debido a que se estima que en el año 2020 se originaron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer¹, siendo el de mama, pulmón y próstata los más comúnmente diagnosticados^{1,2}, lo que implica un impacto negativo en la esperanza y calidad de vida en todos los países del mundo. Actualmente existen muchos tipos de tratamiento contra el cáncer, muchos de ellos aún bajo estudio experimental; sin embargo, los tratamientos ampliamente utilizados son la cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia combinada y terapia con láser³. Hoy en día, a pesar de estos avances, la opción prometedora es la quimioterapia; no obstante, muchos pacientes experimentan diversos efectos adversos, dentro de los que se encuentran fatiga, náuseas, pérdida de apetito y el fracaso al tratamiento relacionado a la resistencia a estos medicamentos, además de presentar un límite terapéutico estrecho⁴.

En este sentido, la investigación de moléculas que tengan la función principal de combatir las células cancerosas, evitando su propagación, ha sido de gran importancia en los últimos años⁵. Un gran número de compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno como el indazol son farmacológicamente importantes ya que están ampliamente presentes en fármacos con actividad antineoplásica como pazopanib, axitinib y niraparib⁶; sin embargo, existen otras moléculas que continúan progresando en ensayos clínicos controlados. Se ha descrito que algunos de estos compuestos actúan como inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores de serina/treonina cinasas, inhibidores de factores transcripcionales como HIF-1, entre otros blancos⁶.

En ese marco, los microtúbulos conformados por α y β tubulina son uno de los blancos terapéuticos más importantes y estudiados ya que diversos fármacos de uso clínico, incluidos el paclitaxel y los alcaloides de la vinca actúan bloqueando la multiplicación celular al impedir la mitosis, por lo que continuar su estudio brinda

una oportunidad para el diseño racional de fármacos destinado a generar compuestos que se dirijan a la tubulina de formas terapéuticamente más eficaces en comparación con los fármacos actualmente disponibles ⁷.

En el presente trabajo se diseñaron y sintetizaron cinco nuevos compuestos derivados de indazol, como parte de nuestro esfuerzo en la modificación estructural de este tipo de moléculas para la búsqueda de agentes citotóxicos con potencial como agentes anticancerosos. Las moléculas fueron evaluadas en estudios *in silico* empleando métodos computacionales contra tubulina como diana terapéutica. Finalmente se caracterizaron estructuralmente y se evaluó su correspondiente actividad citotóxica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer

El cáncer hace referencia a un grupo de enfermedades en la cual las células se encuentran en un estado anormal debido a que presentan un crecimiento incontrolado, el cual no posee propósitos funcionales formándose un tumor, hecho que representa un grave peligro ya que tiene el potencial de diseminarse a células u órganos adyacentes ⁸. El cáncer a diferencia de muchas enfermedades transmisibles como lo son parásitos y enfermedades ambientales, no es generado por algún agente externo a nuestro cuerpo ya que el agente causal del estadio de la enfermedad son las propias células ⁹.

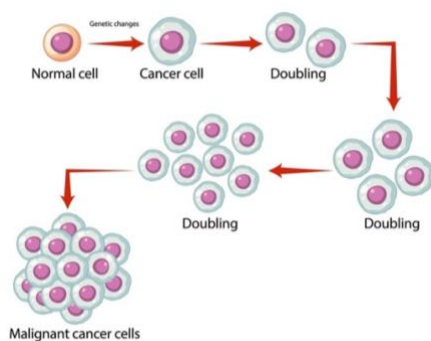


Figura1. Esquema del crecimiento incontrolado de células ¹⁰.

Actualmente el cáncer es un grave problema de salud pública debido a que se estima que hubo alrededor de 19,3 millones de casos nuevos y cerca de 10 millones de decesos en 2020 asociados a esta enfermedad. Tomando en cuenta lo anterior, es importante destacar que es una de las principales causas de muerte, dado que la Organización Mundial de la Salud estima que es la primera o segunda causa de muerte antes de la edad de 70 años en 112 de 183 países y ocupa el tercer o cuarto lugar en otros 23 países ¹.

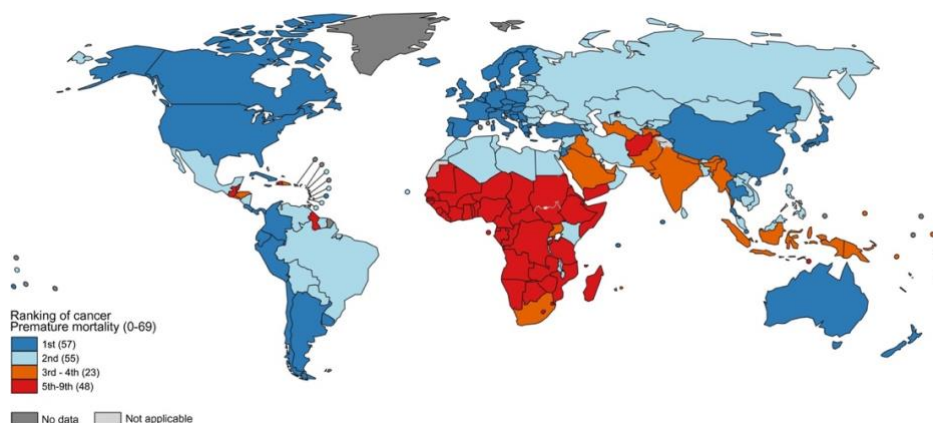


Figura 2. Ranking nacional de cáncer como causa de muerte en edades <70 años en 2020.

En México, al igual que en el resto del mundo, el cáncer es uno de los mayores desafíos en salud pública, debido a diversas problemáticas como lo son la falta de capacidad de intervención del primer nivel de atención, lo cual repercute en un diagnóstico tardío, la falta de medicamentos para la atención a los pacientes y la falta de coordinación del sistema de salud, lo cual se considera una barrera para incrementar la expectativa de vida en la población ¹¹.

En este sentido, es importante mencionar que en México la tasa de defunciones por esta causa aumentó de forma constante, al pasar de 6.09 defunciones por cada 10 mil personas en 2010 a 7.06 en 2021, los cuales son datos alarmantes debido a que se observa un incremento en dicha tendencia ¹².

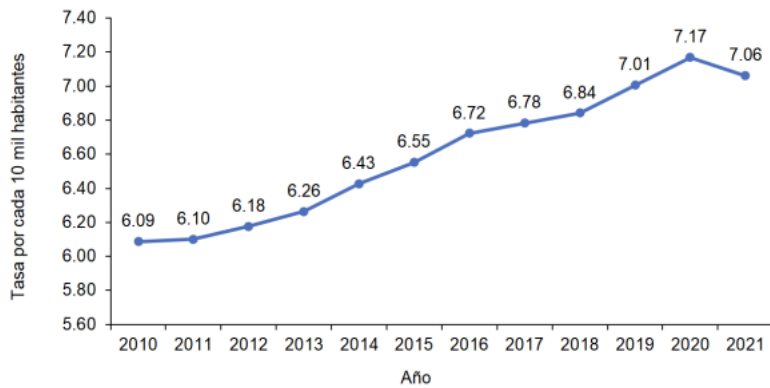


Figura 3. Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro en México.

Por otro lado, en la Figura 4 se presentan los principales tipos de cáncer que afectaron a la población mexicana en 2022, para ambos sexos y todas las edades, siendo el de mama el de mayor número de casos, seguido de próstata, colorrectal, tiroides y cérvico-uterino ¹³.

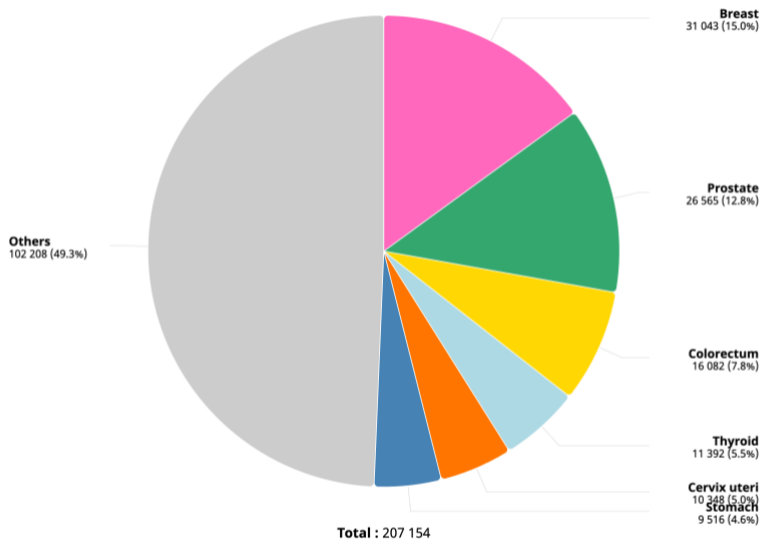


Figura 4. Número de casos nuevos en México en el 2022, ambos sexos, todas las edades.

2.2 Tratamiento del cáncer

Tomando en cuenta los datos preocupantes sobre el incremento dinámico en la tasa de defunciones asociados al cáncer, la investigación en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos es de gran importancia. Las causas del

desarrollo de un tumor maligno pueden deberse a diversos factores como trastornos genéticos, hábitos alimenticios poco saludables, exposición prolongada a radiaciones y/o ingesta de sustancias tóxicas, así como a procesos inflamatorios crónicos ⁸.

En este sentido es importante mencionar que el propósito fundamental para cualquier plan de tratamiento contra el cáncer es la rescisión completa de los tejidos cancerosos sin provocar daños a los tejidos adyacentes, es por ello que los tratamientos actualmente disponibles dependerán según el tipo de cáncer y en que estadio se encuentre; sin embargo las opciones de tratamiento pueden incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida ⁸; aunque en muchos casos es recomendable llevar a cabo un plan de tratamiento en la cual se puedan integrar una combinación de los métodos anteriormente descritos para mejorar el pronóstico y obtener la máxima eficacia del tratamiento.

El tratamiento con quimioterapia se lleva a cabo por medio del uso de uno o varios fármacos, los cuales tienen el objetivo de interferir con el crecimiento de las células tumorales, quienes son administrados en cantidades determinadas durante periodos de tiempo preestablecidos. La mayoría de los medicamentos quimioterapéuticos desempeñan su función interfiriendo con la división celular u obstaculizando la síntesis de ADN. Según su mecanismo de acción se pueden clasificar en agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, inhibidores de la topoisomerasa y alcaloides vegetales ¹⁴.

No obstante, a pesar de contar con las formas tradicionales y diversas opciones innovadoras, la heterogeneidad intratumoral de las células cancerosas es la principal barrera del objetivo de encontrar tratamientos seguros y eficaces¹⁵, ya que con los tratamientos tradicionales, especialmente hablando los medicamentos quimioterapéuticos, con frecuencia también tienen impacto en las células sanas, lo que ocasiona efectos secundarios indeseables como náuseas, dolor, cardiotoxicidad, depresión del sistema inmune e inclusive que las células

cancerosas que no son suprimidas adquieran resistencia al tratamiento^{14,16} y en última instancia resulten en un cáncer más agresivo afectando negativamente en la calidad de vida de los pacientes. Es por ello que es de suma importancia la búsqueda constante de terapias más eficaces y tolerables.

Un mecanismo de acción importante en el desarrollo de agentes anticancerosos es la alteración de la dinámica de los microtúbulos, debido a que modifican la proliferación, la señalización y la migración celular, por lo que son objeto de estudio como nuevos agentes terapéuticos¹⁷.

2.3 Indazoles

Los indazoles es uno de los grupos más importantes de compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno. Su estructura consta de un anillo bicíclico conformado por un anillo de pirazol y un anillo de benceno. Los indazoles comúnmente contienen tres formas tautoméricas: *1H*-indazol, *2H*-indazol y *3H*-indazol (Figura 5). Es importante mencionar que la identidad del tautómero influye en las propiedades biológicas, siendo el *1H*-indazol y sus derivados los más termodinámicamente estables⁶.

Los derivados de indazol poseen una amplia variedad de actividades farmacológicas como propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antiarrítmicas, antifúngicas, antibacterianas y anti-VIH⁶; en consecuencia, es de gran relevancia el diseño y síntesis de derivados de indazol debido a su amplia gama de bioactividades descritas. Por lo que este trabajo de investigación busca proporcionar información útil para el diseño racional de derivados indazólicos como candidatos antitumorales más potentes.

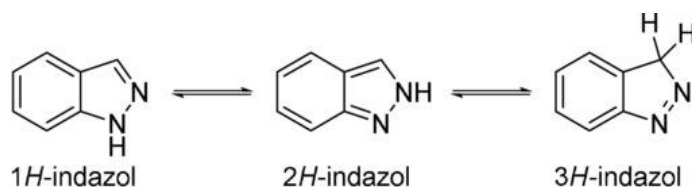


Figura 5. Formas tautoméricas del indazol.

2.4 Diseño de fármacos asistido por computadora

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un proceso largo, complicado y costoso, debido a que se estima que se requiere alrededor de 12 años y 2.7 millones de dólares para contar con un nuevo medicamento a través del método convencional ¹⁸. Actualmente con la innovación tecnológica han emergido herramientas útiles como lo son los enfoques computacionales, los cuales permiten guiar e interpretar experimentos para acelerar el proceso de diseño y desarrollo de fármacos.

El Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFaC) es una herramienta poderosa en el desarrollo de nuevas moléculas con aplicación terapéutica, debido a que es una alternativa menos costosa y más eficiente para llevar a cabo estudios de detección virtual de moléculas potencialmente activas, ya que permite seleccionar compuestos con mejores perfiles de actividad ¹⁹.

El DiFaC es considerada una estrategia multidisciplinaria debido a que se precisa la colaboración de diversos campos incluidos química, química computacional, biología, investigación clínica, entre otros ¹⁹. El uso de esta herramienta tiene diversas aplicaciones, dentro de las más destacables se encuentran ²⁰:

- 1) Identificación de compuestos activos en bases de datos moleculares
- 2) Localización de blancos moleculares para compuestos activos
- 3) Optimización de la actividad biológica de compuestos activos
- 4) Reposicionamiento de fármacos (usos terapéuticos alternos a fármacos aprobados)

El DiFaC generalmente se divide en dos estrategias: I. Diseño de fármacos basado en ligandos, la cual se emplea cuando se conoce la estructura química con actividad biológica pero no se conoce la estructura relacionada con el sitio objetivo. Esta estrategia se centra en ligandos conocidos para establecer una relación entre sus propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas reportadas, conocida como relación estructura actividad (SAR), información que puede emplearse para optimizar compuestos conocidos o guiar el diseño de nuevos fármacos y II. Diseño de fármacos basado en estructura, la cual se utiliza para analizar información

estructural tridimensional del objetivo macromolecular, típicamente de proteínas o ADN, para identificar sitios clave e interacciones que son importantes para sus respectivas funciones biológicas ²¹. Es en este contexto donde el acoplamiento molecular se encuentra entre uno de los métodos *in silico* basados en estructuras más ampliamente utilizados y exitosos, el cual desempeña un papel fundamental en el desarrollo de nuevas moléculas líderes.

2.5 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es un método *in silico* en la cual se llevan a cabo simulaciones computacionales, de manera que nos brindan una predicción de las interacciones que acontecen entre moléculas y blancos biológicos ²². Este proceso se lleva a cabo, en una primera etapa, prediciendo la orientación molecular de un ligando dentro de un receptor mediante la exploración del espacio conformacional. Como resultado se obtienen varios modos de unión potenciales y posteriormente se evalúa su complementariedad mediante el uso de una función de puntuación, que nos brinda información de la conformación de unión mas probable y sus interacciones intermoleculares correspondientes ²³. Los programas de acoplamiento molecular desarrollan este proceso mediante un proceso cíclico, en el que la conformación del ligando se evalúa mediante funciones de puntuación específicas de forma periódica hasta converger en una solución de mínima energía ^{22,23}.

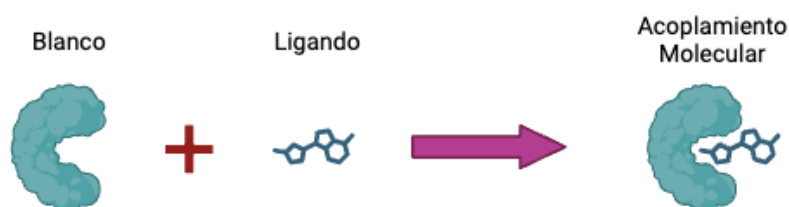


Figura 6. Elementos en el acoplamiento molecular (propia creación).

Dado el potencial que posee esta herramienta, se ha utilizado para diversos objetivos, los cuales incluyen la realización de campañas de detección virtual para

identificación de compuestos que modulan blancos relacionados a determinadas enfermedades y con ello su posible optimización (cribado virtual); la predicción de blancos terapéuticos para compuestos que presentan una buena complementariedad ligando-receptor (identificación de blancos); predicción de blancos potencialmente responsables de reacciones adversas inesperadas a medicamentos (predicción a RAM); identificación y optimización de compuestos que modulan simultáneamente a un grupo de dianas (polifarmacología); identificación de usos novedosos para compuestos con perfiles de seguridad ya establecidos que se encuentran ya en el mercado (reposicionamiento de fármacos); identificación de los determinantes estructurales o quimiotipos necesarios para la asociación efectiva necesaria entre el ligando y el receptor (optimización unión ligando-receptor) ²³.

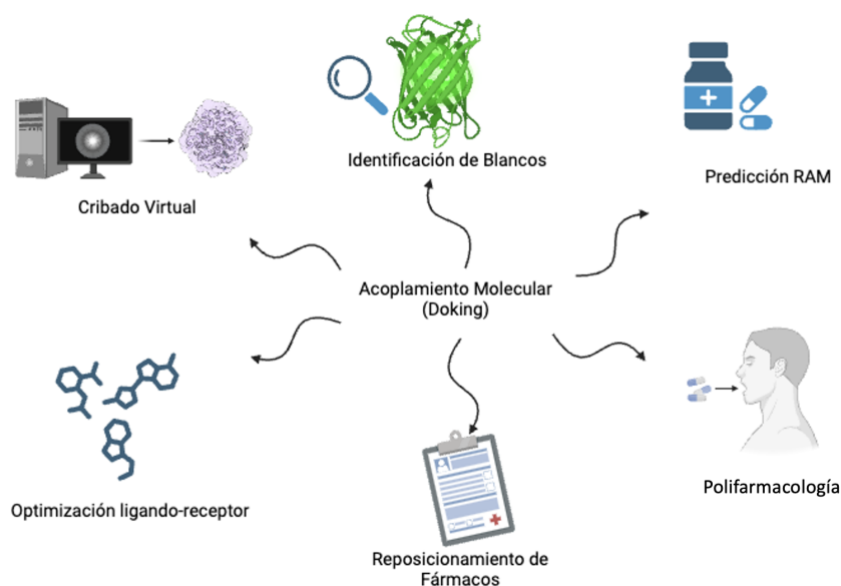


Figura 7. Principales aplicaciones del acoplamiento molecular (propia creación).

2.6 Tubulina como diana terapéutica

La tubulina hace referencia a una familia de proteínas globulares formada por las tubulinas α , β y γ , las cuales se relacionan debido a su semejanza entre sus cadenas de aminoácidos. En este sentido la familia del heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina son

cadenas homólogas, pero no idénticas con aproximadamente 450 aminoácidos, las cuales poseen una masa molar aproximada de 50 kDa y un diámetro de 45 nm, siendo esta parte fundamental de la construcción esencial del citoesqueleto microtubular. Por otra parte, la tubulina γ es componente fundamental del centrosoma ²⁴.

La tubulina presente en organismos eucariontes se ensambla en forma de filamentos conocidos como microtúbulos. Estos se forman mediante la polimerización de los heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, los cuales al ser apilados formarán estructuras conocidas como protofilamentos. Finalmente estas estructuras se juntan para formar tubos huecos, rígidos y no ramificados con un diámetro aproximado de 25 nm ²⁵.

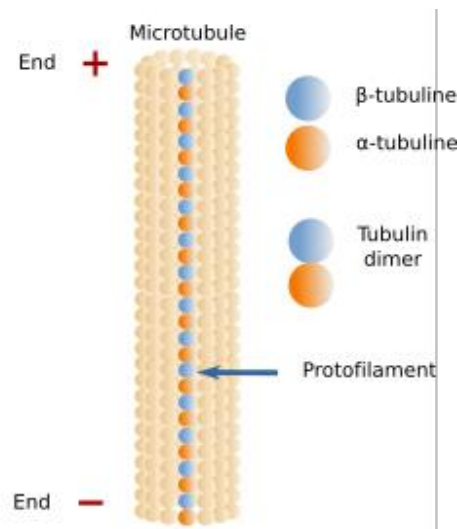


Figura 8. Estructura de los microtúbulos(25).

Un microtúbulo suele estar compuesto por 13 protofilamentos de tubulina alineados conjuntamente, de esta manera los protofilamentos se ensamblan de forma que la tubulina β de un dímero contacta con la tubulina α del dímero siguiente. Debido a la organización de los microtúbulos se consideran que son estructuras polares; es decir en el extremo donde se localiza la tubulina α corresponde al apartado negativo (-) y en contraparte el extremo con la tubulina β al positivo (+), además de ser dinámicos, es decir, polimerizan (crecen) y se despolimerizan (decrecen). Estas

propiedades proporcionan a los extremos (+) y (-) características estructurales y de ensamblaje únicas y orienta la forma del transporte asociado a los microtúbulos ^{24,26}.

Las moléculas dirigidas a los microtúbulos son de gran relevancia para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos, debido a que estas estructuras desempeñan funciones importantes como lo son la migración celular, la función y estabilidad axonal, la mitosis, el estrés mecánico, la polaridad celular y el transporte intracelular ²⁶.

2.7 Dinámica de los microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras altamente dinámicas ya que pueden turnar entre fases de polimerización (incorporación de nuevos dímeros de tubulina) y despolimerización (remoción de dímeros de tubulina) lo cual se da de forma espontánea. Este proceso es conocido como inestabilidad dinámica ²⁷.

La inestabilidad dinámica implica tres fases temporales de polimerización para cada extremo de los microtúbulos: 1) sin crecimiento en un centro de nucleación; 2) alargamiento, generalmente a velocidad constante; 3) acortamiento rápido a una velocidad de 1 a 2 órdenes de magnitud más rápida que el alargamiento ²⁸.

El proceso de polimerización ocurre cuando en el extremo (+) un dímero de $\alpha\beta$ -tubulina que se encuentra libre en el citosol se une a una molécula de trifosfato de guanosa (GTP) añadiendo nuevos dímeros, lo que hace que el microtúbulo crezca en longitud, asumiendo una conformación recta y formando el denominado “casquete” de GTPs; posteriormente las subunidades de tubulina hidrolizan su GTP unido, generando una estructura menos estable y por consiguiente liberando el fosfato hidrolizado (Pi), lo que da paso al proceso de despolimerización, en la cual los dímeros de difosfato de guanosa (GDP) se liberan al citosol, reanudando una conformación curva ^{27,28}.

La inestabilidad dinámica comprende el cambio continuo entre catástrofes (fase de despolimerización o contracción) y rescates (fase de polimerización o crecimiento) de microtúbulos individuales. El cambio entre crecimiento y contracción está estrechamente regulado por el equilibrio de los factores estabilizadores y desestabilizadores de los microtúbulos (Figura 9) ²⁹.

Debido a que la inestabilidad dinámica es muy sensible a las condiciones en los extremos de los microtúbulos, estos se han convertido en un blanco terapéutico para el desarrollo de agentes que puedan alterar significativamente el grado de elongación y estabilidad de los microtúbulos, regulando de esta forma la estructura del citoesqueleto y la división celular ²⁸.

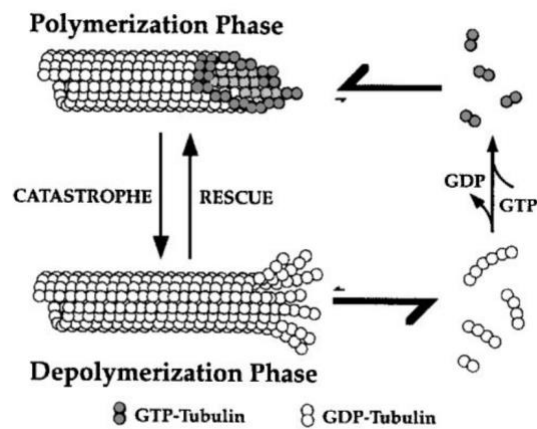


Figura 9. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La inestabilidad dinámica se caracteriza por la coexistencia de microtúbulos polimerizantes y despolimerizantes²⁸.

2.8 Agentes de unión a microtúbulos

Hasta el día de hoy, en los humanos se han identificado diversas isoformas tanto para la tubulina α como para la β (algunos ejemplos de ellas son TUBA1A, TUBA1B, TUBA1C, TUBA3C, TUBA3D, TUBA3E, TUBA4A, TUBA8), las cuales se clasifican con base a sus diferentes secuencias C-terminales. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas están fuertemente conservadas y difieren predominantemente

dentro de los 15 a 20 residuos C-terminales. Las isoformas de tubulina pueden sufrir una amplia variedad de modificaciones postraduccionales como acetilación, destirosinación, poliglutamilación, poliglicilación, fosforilación y palmitoilación^{30,31}.

Estas isoformas pueden afectar las propiedades dinámicas de los microtúbulos, tanto directamente, como a través de la modulación de las proteínas asociadas a los microtúbulos, los cuales están codificados por diferentes genes y es importante conocerlos debido a que muestran una expresión específica de tejido y célula ³¹.

Actualmente se conocen diversas sustancias químicas obtenidas a partir de fuentes naturales como esponjas marinas, bacterias y plantas o mediante derivados sintéticos que se unen a la tubulina e interrumpen su dinámica; estas moléculas son conocidas como agentes dirigidos a microtúbulos (Microtubule-targeting agents “MAT’s”), las cuales suprimen principalmente la dinámica de los microtúbulos sin afectar significativamente la masa del polímero de los microtúbulos. Debido a la importancia mencionada anteriormente de los microtúbulos en las células, los compuestos que se unen a ella, han sido una de las clases de fármacos más relevantes para el tratamiento contra el cáncer ^{32,33}.

Los compuestos dirigidos a los microtúbulos se pueden clasificar en dos grupos principales según su mecanismo de acción. El primero de ellos son los agentes desestabilizadores de los microtúbulos (Tubulin Destabilizing Agents “TDA’s”), los cuales promueven la despolimerización y previenen la polimerización de la tubulina al inhibir la formación de contactos de tubulina nativa o dificultando el cambio conformacional de curva a recta del heterodímero de tubulina que acompaña a la formación de microtúbulos; los cuales incluyen los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina), maitansina, pironetina, colchicina y análogos. El segundo grupo son los agentes estabilizadores de microtúbulos (Tubulin Stabilizing Agents “TSA’s”) quienes promueven la polimerización de la tubulina y estabilizan el polímero, previniendo de esta manera la despolimerización. Esto lo logran al favorecer el ensamblaje de tubulina o estabilizan los microtúbulos mejorando los contactos longitudinales, consolidando las conexiones laterales entre

protofilamentos. Algunos ejemplos incluyen los taxanos (paclitaxel y docetaxel), las epotilonas y la laulimalida/pelorusida ^{17,33,34}.

Si bien la mayoría de los MAT's inhiben la proliferación de células cancerosas, lo hacen sin inducir una estabilización o despolimerización extensa sobre la red de los microtúbulos. El mecanismo exacto de estos compuestos no se comprende completamente; sin embargo la evidencia indirecta sugiere que puede depender principalmente de la interferencia con la dinámica del huso dentro de la célula, por lo que las células afectadas sufren una detención mitótica ya que no logran pasar los puntos de control mitóticos y se detienen en la fase G2/M del ciclo celular ³¹. En las células en división, los microtúbulos que constituyen el huso mitótico son muy dinámicos y muy susceptibles a inhibidores terapéuticos; es por ello que los compuestos que alteran dicha función han sido objetivos importantes contra el cáncer.

Gracias a los avances en biología estructural se ha podido caracterizar e identificar de forma detallada seis sitios de unión de ligandos en la tubulina. Los agentes estabilizadores de microtúbulos (TSA's) se dirigen a dos sitios, mientras que los agentes desestabilizadores de microtúbulos (TDA's) a cuatro (Ver Tabla1) ³². Así mismo se ha investigado con gran detalle los mecanismos moleculares de una gran gama de MAT's, los cuales se presentan a continuación:

Tabla1. Sitios de unión a tubulina

TSA's	TDA's
Taxanos	Colchicina
Lamulida/Pelorusida	Vinca
	Maytansina
	Pironetina

Agentes de unión al dominio de Taxano: El primer exponente de este dominio fue paclitaxel, cuya estructura se resolvió en 1998 basándose en datos de cristalografía

electrónica. Todos los ligandos de este sitio se unen a una cavidad de la β -tubulina ubicada en el lado luminal de los microtúbulos los cuales establecen contactos tanto hidrofóbicos como polares.

Agentes de unión al dominio de Laulimalida/Pelorusida: Laulimalida y pelorusida A son potentes TSA aisladas de las esponjas marinas *Mycale hentscheli* y *Cacospongia mycofijiensis*, respectivamente. Su sitio de unión se encuentra en la β -tubulina; sin embargo, a diferencia del sitio del taxano, su espacio se localiza cerca de la interfaz lateral entre los protofilamentos en la superficie exterior del microtúbulo. Este sitio está formado por residuos hidrófobos y polares.

Agentes de unión al dominio de Colchicina: Los ligandos del sitio de colchicina son probablemente la clase de TDA más estudiada ya que son compuestos principales de los agentes disruptores vasculares, compuestos que producen una rápida interrupción del flujo sanguíneo tumoral ¹⁷. El sitio de colchicina es una cavidad profunda en su mayor parte enterrada en el dominio intermedio de la β -tubulina, que se encuentra cerca de la interfaz intradímero entre las subunidades de $\alpha\beta$ -tubulina. En el estado unido, todos los elementos estructurales secundarios centrales del sitio de colchicina interactúan con el ligando a través de contactos principalmente hidrófobos y muy poco polares. La unión de un ligando al sitio de colchicina inhibe la formación de microtúbulos principalmente al prevenir el cambio conformacional de curva a recta en la tubulina ³².

Agentes de unión al dominio de Vinca: Los alcaloides de la vinca, originalmente aisladas de la planta *Catharanthus roseus*, es la más antiguamente conocida y hasta el día de hoy la familia más diversificada de agentes dirigidos a microtúbulos. Los ligandos que se dirigen al sitio vinca se unen en la interfaz entre dímeros de tubulina alineados longitudinalmente. 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 una cavidad que se extiende hacia el sitio del nucleótido de guanosina intercambiable en la β -tubulina. La desestabilización de los microtúbulos mediante

ligandos del sitio vinca se logra introduciendo una "cuña" molecular en la punta de los microtúbulos, que evita la transición curvada a recta de la tubulina necesaria para la incorporación adecuada a los microtúbulos, o secuestrando los dímeros de tubulina en oligómeros en forma de anillos que son incompatibles con la estructura de protofilamentos rectos en los microtúbulos.

Agentes de unión al dominio de Maitansina: El sitio de maitansina es distinto del sitio de vinca y está ubicado en una cavidad expuesta de la β -tubulina. Se encuentra adyacente al nucleótido de guanosina y está formado por residuos hidrófobos y polares. Los ligandos del sitio de 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 tubulina-ligando incompetentes para el ensamblaje en altas concentraciones de ligando.

Agentes de unión al dominio de Pironetina: La pironetina es el único producto natural caracterizado cristalográficamente por unirse únicamente a la α -tubulina. Este policétido se aisló simultáneamente del caldo de fermentación y la pasta celular de las cepas de bacterias *Streptomyces prunicolor* y *Streptomyces sp.* La pironetina se une covalentemente a la α -tubulina mediante un mecanismo de ajuste inducido. Esto podría promover el desmontaje de los microtúbulos ya que la interfaz entre las subunidades de tubulina α y β se altera, impidiendo el ensamblaje longitudinal.

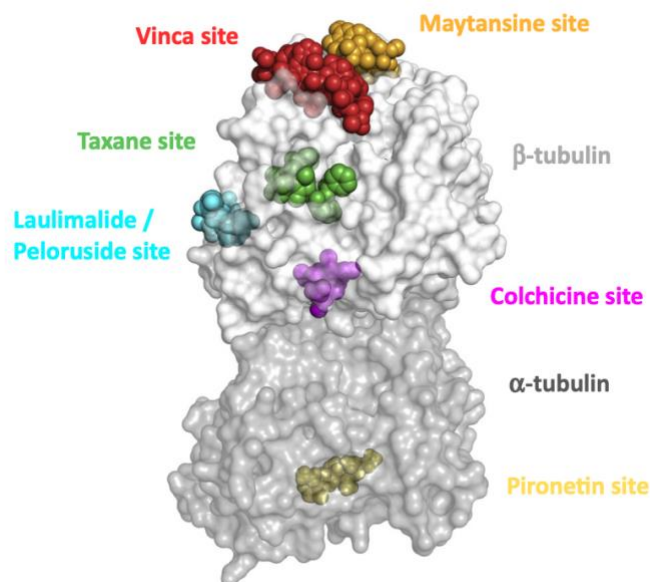


Figura 10. Representación de los sitios de unión de moléculas dirigidas al heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina. La α -tubulina se presenta en gris oscuro y la β -tubulina en gris claro, ambas se exhiben en una representación de superficie semitransparentes con ligandos unidos. Las estructuras de ligandos representativos de cada sitio se superpusieron a sus respectivos sitios de unión. Para resaltar los distintos sitios de unión, todos los ligandos se muestran en representación esférica y están coloreados en verde (sitio taxano), azul (sitio laulimalida/pelorusida), magenta (sitio colchicina), rojo (sitio vinca), naranja (sitio maytansina), amarillo (sitio de pironetina) ³².

3. ANTECEDENTES

En el laboratorio de síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas de la UAM Xochimilco se realizó un trabajo sobre el diseño y la síntesis de compuestos híbridos entre el compuesto con efecto citotóxico 2,3-difenil-2*H*-indazol (DBEC04) y el inhibidor de la polimerización de tubulina combretastatina A4 (CA-4). El objetivo de la síntesis de estos híbridos fue incrementar el efecto citotóxico, reemplazando el puente de etileno en CA-4 por un núcleo heterocíclico de indazol, y así obtener una estructura más rígida y estable, ya que la isomerización del *cis*-estilbeno en CA-4 al *trans*-estilbeno provoca una disminución significativa de la actividad antiproliferativa (Figura 11).

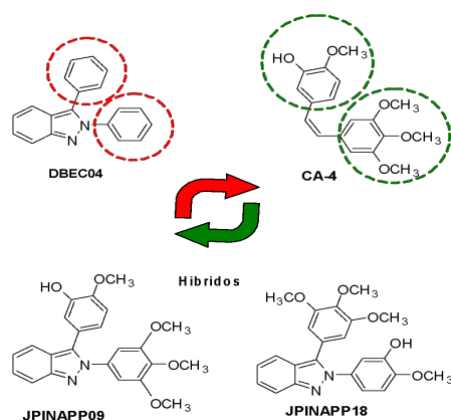


Figura 11. Diseño de los híbridos reportados por nuestro grupo de trabajo.

Los derivados de indazol de este estudio, mostraron una fuerte actividad citotóxica contra una línea celular de cáncer cérvicouterino, HeLa, incluso mejor que el fármaco de referencia, cisplatino, a través de la inhibición de la polimerización de los microtúbulos ³⁵.

Tabla 2. Actividad citotóxica (CI₅₀ [μM] ± DE) para los compuestos **JPINAPP09**, **JPINAPP18** y los compuestos de referencia **DBEC04**, cisplatino e imatinib

Compuesto	HeLa	SK-LU-1	K562
DBEC04	125.8±14.8 ¹	96.43±8.65	>120
JPINAPP09	0.16±0.01	6.63±0.52	1.68 ± 0.27
JPINAPP18	38.6±7.51	25.21±9.06	18.59±1.56
Cisplatino	18.5 ± 3.0	12.0±2.5	-
Imatinib	-	-	2.37±0.12

Sobre el compuesto **JPINAPP09** se realizaron ensayos *in vitro* de inhibición polimerización de tubulina, y sobre cuantificación la fracción de tubulina polimerizada y despolimerizada, lo que proporcionó elementos para establecer que este compuesto actúa como agente despolimerizador de la tubulina. No obstante, otros mecanismos adicionales podrían estar implicados en el efecto citotóxico observado. Por otra parte, estudios de citometría de flujo mostraron que **JPINAPP09** induce muerte celular por apoptosis sobre la línea celular HeLa.

En estudios de acoplamiento molecular se observó que existe la posibilidad de incluir grupos funcionales sobre la molécula **JPINAPP09** en las posiciones 5 y 6 para aprovechar y ocupar una cavidad muy cercana en este sitio de unión de la colchicina (Figura 12) y así se podría mejorar la afinidad por la β -tubulina ³⁶.



Figura 12. Imagen tridimensional del sitio de unión a colchicina acoplado con el compuesto híbrido **JPINAPP09**. En color rojo se resalta la cavidad que puede ocuparse al incorporar grupos en las posiciones 5 y 6 del núcleo de indazol³⁶.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta que el cáncer tiene un impacto negativo en diversas áreas como lo son los pacientes al disminuir su esperanza y calidad de vida, así como un componente económico debido a la falta de productividad ausente y los costos por el tratamiento de los mismos, es considerado un grave problema de salud pública ¹. En este sentido en los últimos años se han empleado en la clínica diversos compuestos con actividad antineoplásica con resultados positivos; sin embargo aún presentan muchas deficiencias ya que muestran efectos adversos indeseables en los pacientes durante el tratamiento. Por lo tanto, existe una necesidad crítica de desarrollar quimioterapias novedosas y más seguras, que puedan escapar de los mecanismos de resistencia adquiridos y minimizar la toxicidad fuera del objetivo.

Debido al éxito de los agentes dirigidos al heterodímero α/β -tubulina, es una diana terapéutica alternativa atractiva, ya que podrían mejorar la especificidad tumoral y la insensibilidad a los mecanismos de quimiorresistencia, por lo cual se podría mejorar la focalización, la selección y la adaptación de la terapia. En la búsqueda

de optimización de los tratamientos disponibles, se plantean una serie de derivados indazólicos para su evaluación como posibles agentes antimitóticos.

5. HIPÓTESIS

Dado que los indazoles **JPINAPP09** y **JPINAPP18** tienen propiedades citotóxicas en diferentes modelos, al añadir sustituyentes en las posiciones 5 y 6 del núcleo del indazol mejorará la afinidad en estudios *in silico* y también mejorará la actividad citotóxica *in vitro*.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Diseñar, sintetizar, caracterizar y evaluar diferentes derivados de indazol como agentes citotóxicos en diferentes líneas celulares de cáncer.

6.2 Objetivos particulares

- Estudiar la afinidad de los derivados de indazol propuestos sobre la interfaz α/β -tubulina por medio de programas de acoplamiento molecular.
- Realizar la predicción de propiedades fisicoquímicas de interés farmacéutico sobre los compuestos planteados.
- Sintetizar 5 derivados indazólicos, diseñados a partir de 2,3-difenil-2*H*-indazol.
- Caracterizar las estructuras de los compuestos mediante técnicas espectroscópicas.
- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos sobre las líneas celulares de cáncer: HeLa (cervicouterino) y SK-LU-1 (pulmón).

7. METODOLOGÍA

7.1 Diseño de derivados indazólicos

Los compuestos diseñados para el presente trabajo se muestran en la Figura 13. En los compuestos propuestos se agregó el grupo 1,3-Dioxolano en las posiciones 5 y 6 del núcleo indazólico para ocupar la cavidad cercana al sitio de unión de la

colchicina. Se conservó el patrón de sustitución de los anillos aromáticos de los híbridos **JPINAPP09** y **JPINAPP18** (compuestos **AMCII** y **AMCIII**). Además, se repitió el anillo aromático disustituido con el sustituyente -OCH₃ en posición *para* y el sustituyente -OH en posición *meta* en los lugares 2 y 3 del indazol (compuesto **AMCV**) y la conservación de este solo en el lugar 2 (compuesto **AMCIV**). Finalmente se planteó una molécula (compuesto **AMCI**) sin sustituyentes en los anillos aromáticos, con el objetivo de analizar la importancia de los farmacóforos de los híbridos estudiados.

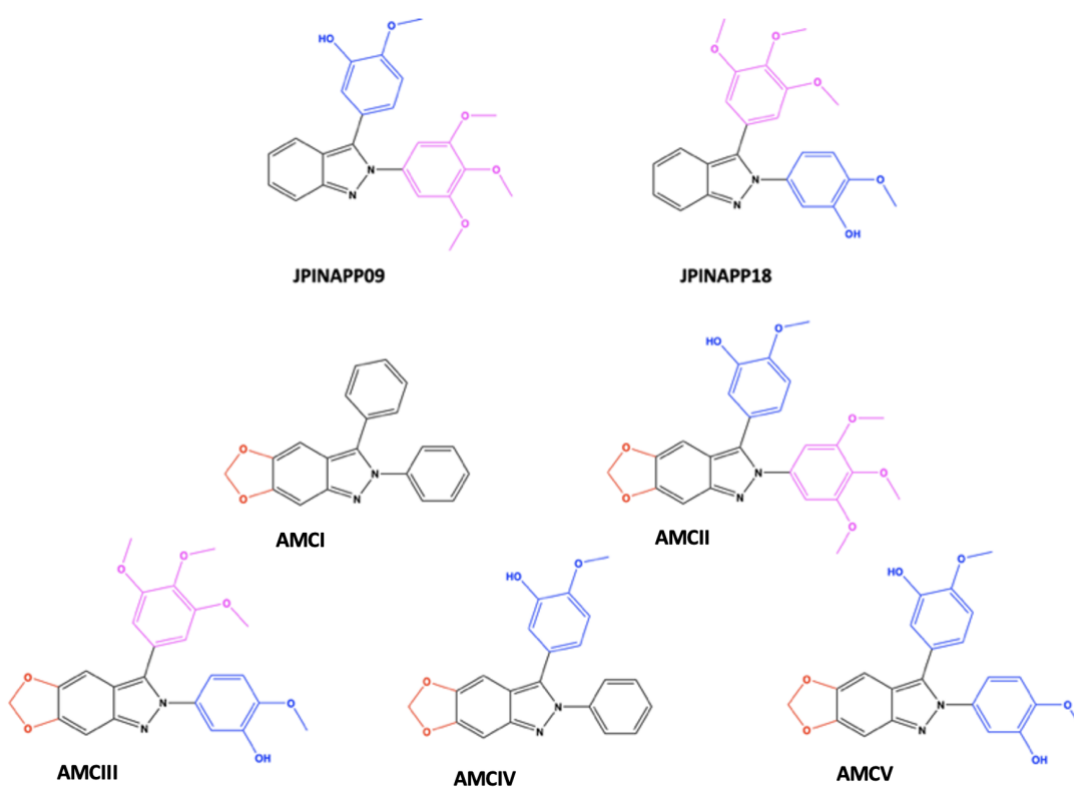


Figura 13. Estructura de los híbridos **JPINAPP09**, **JPINAPP18** y los compuestos indazólicos propuestos **AMCI–V**. En color rojo se aprecia el grupo 1,3-dioxolano, en rosa y azul se presentan los grupos farmacóforos de los compuestos híbridos.

7.2 Predicción de las propiedades fisicoquímicas

Las estructuras de los ligandos en 2D se elaboraron con el programa ChemSketch 2019.2.0 y posteriormente se generaron los códigos SMILES de las correspondientes moléculas. Los códigos SMILES obtenidos se emplearon para la determinación de parámetros fisicoquímicos y de descriptores de interés

farmacéutico (PM, LogP, enlaces rotables, HD, HA, tPSA) con la ayuda de la plataforma SwissADME ³⁷.

7.3 Acoplamiento molecular dirigido

Preparación de ligandos

Los ligandos fueron construidos desde cero mediante el programa ChemSketch y fueron guardados en formato MDL molfile (*.mol). A continuación, las estructuras fueron protonadas o desprotonadas a pH fisiológico y posteriormente fueron optimizadas, empleando el campo de fuerza universal (UFF, *Universal Force Field*) por medio del software *Avogadro v1.0.1* ³⁸; las estructuras obtenidas se guardaron en formato PDB para su posterior uso. Asimismo, se empleó el software *AutoDock Tools v1.5.6* ³⁹ como interfaz gráfica para generar los archivos (*.pdbqt).

Preparación de la proteína

La estructura cristalográfica del blanco de interés (complejo tubulina-combretastatina A-4) se obtuvo de la base de datos *Protein Data Bank* ⁴⁰ con código PDB: 5LYJ en formato PDB. Se seleccionaron las cadenas α y β de la estructura proteica, debido a que contienen el sitio de unión de interés. La proteína fue preparada con el programa *UCSF Chimera v1.15* ⁴¹ para la remoción de moléculas de agua, cofactores, el ligando cocrystalizado CA-4 y la adición de átomos de hidrógeno. Se realizó la minimización de la estructura con el campo de fuerza AMBER ff14sb. Finalmente, se empleó la interfaz gráfica *AutoDock Tools v1.5.6* para la asignación de cargas parciales con el método de Gasteiger-Marsilli a todos los átomos, generando un archivo en formato pdbqt.

Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular de las moléculas propuestas se realizó utilizando los programas *AutoDock 4.2* ³⁹, *AutoDock Vina* ⁴² y *GOLD* ⁴³. Se ejecutó el análisis mediante los tres programas de las cinco moléculas propuestas para determinar aquellos ligandos con mejor potencial de unión para su posterior síntesis. Esta evaluación fue llevada a cabo por los softwares tomando en cuenta interacciones

electrostáticas, geométricas, de Van der Waals, interacciones de Coulomb y la formación de puentes de hidrógeno entre los ligandos y la proteína.

Para realizar la validación del estudio, se llevó a cabo el docking de la estructura co-cristalizada presente en la proteína (en este caso la CA-4), debido a que es un compuesto con una conformación y orientación conocida dentro del sitio de unión de la colchicina en la proteína. Con esta información se determinó el RMSD (Root Mean Squared Desviation) de la CA-4 construida y la co-cristalizada lo que permitió comparar estas dos conformaciones y medir la calidad de la reproducción de los resultados obtenidos. Para tal efecto se consideró una validación apropiada si en los programas se logró obtener poses con un RMSD menor a 2 Å. Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular fueron analizados en el programa *AutoDock Tools v1.5.6* y *PyMOL v2.4.0*, mientras que los diagramas de interacción en 2D se generaron con el software *Discovery Studio Visualizer v20.1.0*.

1) Acoplamiento molecular con *AutoDock 4.2*

Utilizando la proteína preparada se acotó la caja de búsqueda (Grid Box) utilizando Autogrid, la cual se centró en el sitio de unión de CA-4 (coordenadas X= 17.85, Y= 65.75 y Z= 42.59) con una dimensión de 40x40x40 Å y espaciado de 0.375 Å. Los cálculos se llevaron a cabo utilizando el algoritmo genético tipo Lamarckiano empleando las condiciones estándar y con un número de corridas de 100. Se realizó el análisis de los resultados para cada uno de los grupos generados, seleccionando las conformaciones de mínima energía; es decir las de menor ΔG .

2) Acoplamiento molecular con *AutoDock Vina*

Los cálculos de acoplamiento se realizaron acotando la caja de búsqueda (Grid Box) utilizando Autogrid, la cual se centró en el sitio de unión de CA-4 (coordenadas X= 17.85, Y= 65.75 y Z= 42.59) con una dimensión de 40x40x40 Å y espaciado de 0.375 Å. Se utilizó un número de 500 evaluaciones como exhaustividad de cálculo y se seleccionaron solamente las conformaciones energéticamente favorables. Se

realizó el análisis de los resultados para cada uno de los grupos generados, seleccionando las conformaciones de mínima energía; es decir las de menor ΔG .

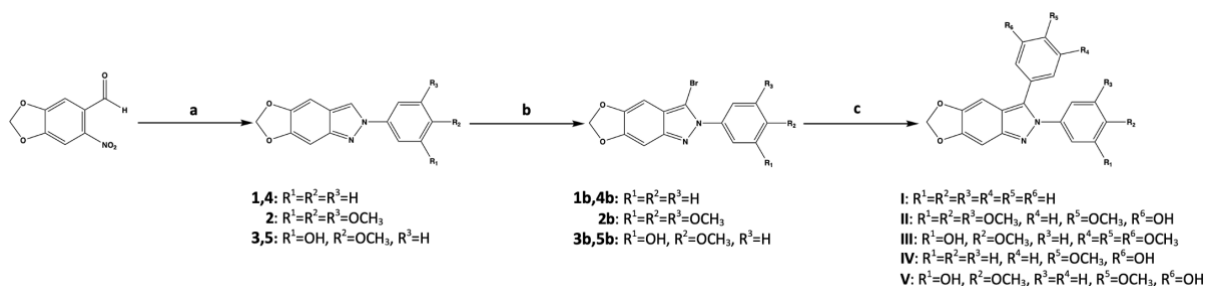
3) Acoplamiento molecular con *GOLD*

Para el uso de este software se emplearon ChemPLP y GoldScore como funciones de puntuación, las cuales son adimensionales y van de una escala de 0 a 100. En estas funciones mientras mayor sea el score, mayor será la interacción ligando-proteína. El cálculo se realizó acotando la caja de búsqueda (Grid Box) en el centro del sitio de unión de CA-4 (coordenadas X= 17.85, Y= 65.75 y Z= 42.59) con una dimensión de área de 10 Å y 100 corridas como número de evaluaciones. Finalmente, al término de la evaluación se seleccionaron las conformaciones con mejor función de puntuación y por tanto mayor afinidad por el sitio de interés.

7.4 Síntesis

Síntesis general para las moléculas **AMCI-V**

La ruta de síntesis general de los compuestos derivados planteados fue llevada a cabo empleando en una primera etapa, la reacción de Cadogan ⁴⁴ con una ligera modificación, la cual consta de la formación de una imina, seguida de una ciclación. Posteriormente, se realizó una bromación sobre la posición 3 del núcleo del indazol y a continuación se llevó a cabo una reacción de acoplamiento (Suzuki-Miyaura) catalizada por paladio para dar los compuestos finales. Los procedimientos generales para la preparación de los productos se describen a continuación (Esquema 1):



Esquema 1. Síntesis de intermediarios y productos finales I–V. Reactivos y condiciones: (a) 1. Anilina o anilina sustituida, EtOH; 2. P(OEt)₃, 150°C; (b) Br₂, AcOH; (c) Ácido fenilborónico apropiado o éster de pinacol del ácido fenilborónico, 1-propanol, Pd(OAc)₂, (C₆H₅)₃P, Na₂CO₃, H₂O.

7.5 Materiales y equipos

La síntesis y purificación de los compuestos **AMCI–V** (Figura 13), así como sus intermediarios, se realizó en el laboratorio de síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas (N-015) del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Las materias primas empleadas fueron marca Sigma-Aldrich grado reactivo y los disolventes orgánicos marca J.T. Baker y Química Rique grado analítico. Para la síntesis de los compuestos, se empleó un equipo de microondas Anton Parr Monowave 300. El monitoreo y avance de las reacciones se determinaron por medio de cromatografía en capa fina (CCF) en placas de vidrio de gel sílice 60 F254 de la marca Merck. La purificación de los productos obtenidos se realizó mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel sílice 60 fase normal, con un tamaño de poro de 0.063-0.2 mm. La determinación del punto de fusión de los compuestos se realizó en un equipo Fisher-Johns. Los productos se caracterizaron mediante espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ¹H) en un espectrómetro marca Varian de 600 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y CDCl₃ como disolvente.

Procedimiento para la obtención de los intermediarios 1–5

En dos viales para microondas de 10 mL se agregaron 6-nitropiperonal (5.124mmol) y la anilina con el patrón de sustitución deseado (5.124mmol) y se sometieron a sonicación por 2 horas para producir la base schiff correspondiente. El producto se transfirió a un matraz bola para ser tratado con P(OEt)₃ (15.372mmol) y se calentó a reflujo a 150 °C por un lapso de 2 a 3 horas hasta observar el consumo total de la materia prima por cromatografía en capa fina. El

exceso de P(OEt)₃ fue oxidado con 20 mL de H₂O₂ al 5%. Posteriormente el producto se extrajo con tres fracciones de 20 mL de AcOEt, las fases orgánicas se juntaron y fueron lavadas con 10 mL de una solución saturada de NaCl y se trataron con Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica se filtró, se evaporó el disolvente en el rotavapor y finalmente el producto fue purificado mediante cromatografía en columna, utilizando como fase móvil hexano/AcOEt en proporción 80:20.

Procedimiento para la obtención de los intermediarios **1b-5b**

En un matraz bola se colocó el derivado apropiado de 2,3-difenil-2*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*f*]indazol **1-5** (1.827mmol) y se disolvió en 5 mL de CH₃COOH. Posteriormente la solución formada fue tratada gota a gota con una solución de Br₂/CH₃COOH 1M (1.1 equivalentes de Br₂) durante un lapso de 3 horas en agitación constante. El producto se vertió en un vaso de precipitados con agua en hielo y se agitó. El precipitado resultante se filtró al vacío y se secó. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna abierta, utilizando como fase estacionaria gel sílice 60 fase normal y hexano/CHCl₃/AcOEt como fase móvil en proporción 50:35:15.

Procedimiento para la obtención de los productos finales **AMCI-V**

En un vial de microondas de 10 mL se agregó el 3-bromoindazol adecuadamente sustituido (compuestos **1b-5b**, 0.4911 mmol), el ácido o éster fenil borónico sustituido (0.5402mmol), Pd(AcO)₂ (0.0049 mmol), (C₆H₅)₃P (0.0147 mmol), Na₂CO₃ (0.9822 mmol), Agua (0.6 mL) y *n*-propanol (3 mL). La mezcla fue calentada a 150 °C bajo radiación en un reactor de microondas durante 20 minutos. Una vez concluida la reacción se vertió en 15 mL de agua y a continuación se realizó la extracción del producto con AcOEt (15x3 mL). La fase orgánica se lavó con solución saturada de NaCl (15 mL), secada con Na₂SO₄ anhidro y finalmente se evaporó el disolvente al vacío en un rotavapor. El producto fue purificado por cromatografía en columna empleando como fase móvil hexano/AcOEt 80:20 para los compuestos **AMCI** y **AMCIV**, 90:10 para el compuesto **AMCII** y 95:5 para los compuestos **AMCIII** y **AMCV**. Los sólidos se recuperaron en un vial y se analizaron.

7.6 Evaluación de la actividad citotóxica

Los compuestos finales (**AMCI-V**) fueron evaluados en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del C.M.N SXXI, bajo la tutoría del Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez. Se realizó la evaluación citotóxica sobre dos líneas celulares de cáncer humano: HeLa (cérvico-uterino) y SK-LU-1 (pulmón) mediante el ensayo de sulforodamida B. Se emplearon placas de 96 pozos, en cada uno de ellos se cultivaron 3000 células viables de las líneas anteriormente descritas. Las células se cultivaron durante 24 horas en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂). Los productos a evaluar **AMCI-V**, fueron solubilizados en DMSO para obtener una solución stock a 10 mM y con ello preparar las diluciones seriadas.

Una vez observada una confluencia del 80%, las células se incubaron con los compuestos a 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 μM por un lapso de 48 horas bajo las condiciones de cultivo estándar anteriormente descritas. Cada ensayo se realizó por triplicado para determinar el cálculo de la CI₅₀. Asimismo, se utilizó a la CA-4 como control positivo con concentraciones de 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0062, 0.0031, 0.0015 y 0.0007 μM y como control negativo se emplearon a las células sin tratamiento.

Al término del periodo de incubación, las células fueron fijadas con 50 μL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 50% (v/v) durante 2 horas a una temperatura de 4 °C. En seguida se desechó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados con agua para posteriormente dejar secar las placas a temperatura ambiente. Después las placas fueron tratadas con 100 μL de una solución de sulforodamida B al 0.08% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, el exceso de sulforodamida B se retiró y se procedió a eliminar inespecificidades mediante lavados con una solución de ácido acético al

1%, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, el colorante unido al contenido celular se liberó con un medio alcalino, añadiendo 100 μ L de una solución Tris 10 mM con pH 10.5. Para realizar la medición de la densidad óptica, se empleó un lector de microplacas ELx800 BioTek a una longitud de onda de 490 nm. Con los resultados de absorbancias obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento celular comparada con el control para determinar la CI_{50} mediante el software PROBIT. Asimismo, se tomaron imágenes de la morfología celular al microscopio invertido Carl Zeiss Axiovert 25 para examinar los cambios morfológicos provocados por el efecto de los compuestos **AMCI-V**.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Síntesis de nuevos derivados

Los compuestos **AMCI-V** fueron obtenidos de manera exitosa mediante la metodología descrita en el apartado 7.4. Al llevar a cabo las tres etapas de reacción se obtuvieron sólidos de aspecto cristalino opaco, a los cuales se les determinó su estado físico, punto de fusión y caracterización RMN de 1H con el objetivo de asegurar que los compuestos obtenidos fueran los esperados y con una pureza aceptable.

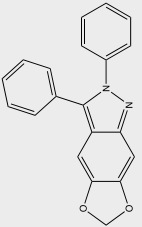
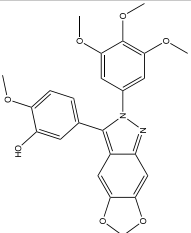
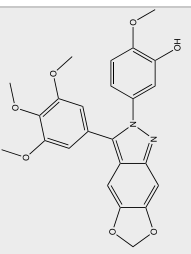
El rendimiento de los intermediarios **1**, **2** y **4** para la primera etapa (reacción de Cadogan) fueron buenos, debido a que se obtuvo un rendimiento del 80%; sin embargo para los intermediarios **3** y **5** se obtuvieron rendimientos inferiores, ya que se observó mediante el monitoreo en cromatografía en capa fina la formación de un subproducto de igual proporción al producto de interés (el cual puede ser atribuido a la alquilación del grupo hidroxilo presente en la anilina empleada), por lo cual tuvo que ser detenida la reacción y tratada de esa forma. Debido a lo anterior, no se logró consumir de manera total la materia prima.

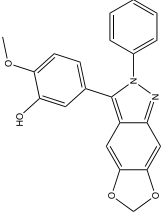
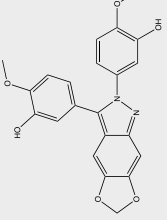
En cuanto a los intermediarios **1b-5b**, en la segunda etapa (reacción de bromación) se obtuvieron rendimientos más variables que oscilan en un rango del 60-70%. El decremento en el porcentaje de rendimiento se atribuye a la presencia de diversos

subproductos, ya que los intermediarios son susceptibles a bromaciones en diferentes posiciones (polibromaciones), y en todos los casos no se logró consumir en su totalidad la materia prima.

Finalmente, en la etapa de acoplamiento cruzado (acoplamiento de Suzuki-Miyaura) se obtuvieron los rendimientos más bajos debido a las diversas etapas de purificación necesarias. En particular para los compuestos finales **AMCIII** y **AMCIV** se observó por cromatografía en capa fina, un subproducto que sugiere la pérdida del bromo de la materia prima debido al empleo del catalizador de paladio. La descripción y las propiedades de los compuestos obtenidos se muestran en la tabla 3

Tabla 3. Resultado de los nuevos derivados sintetizados

Compuesto	PM (g/mol)	Estado físico	P.f.(°C)	Rendimiento (%)	¹ H RMN (600 MHz, CDCl ₃)
 <p>AMCI</p>	314.34	Polvo blanco	130–133	59	¹ H NMR (600 MHz, cdcl ₃) δ 7.40 – 7.38 (m, 4H), 7.38 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 5H), 7.37 (s, 5H), 7.37 (s, 4H), 7.36 (s, 5H), 7.35 (s, 5H), 7.34 (s, 3H), 7.33 (s, 3H), 7.31 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 5H), 7.30 (s, 5H), 7.05 (s, 4H), 6.91 (s, 5H), 5.98 (s, 10H).
 <p>AMCII</p>	450.45	Polvo blanco	165–167	29	¹ H NMR (600 MHz, cdcl ₃) δ 7.01 (s, 1H), 6.96 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.86 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 6.78 (dd, <i>J</i> = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 2H), 5.97 (s, 2H), 5.73 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.70 (s, 6H).
 <p>AMCIII</p>	450.45	Polvo blanco	225–227	15	¹ H NMR (600 MHz, cdcl ₃) δ 7.04 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.82 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.79 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H), 6.50 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 5.29 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.71 (s, 6H).

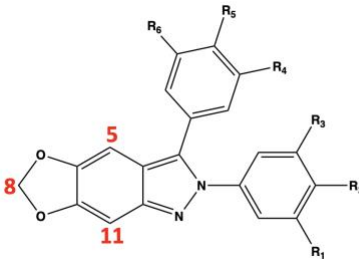
 <p>AMCIV</p>	360.37	Polvo marrón	210–214	26	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, cdCl_3) δ 7.95 (s, 1H), 7.35 (s, 2H), 7.32 (s, 2H), 7.27 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 5.94 (s, 2H), 3.86 (s, 3H).
 <p>AMCV</p>	406.39	Polvo marrón	220–224	24	$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, cdCl_3) δ 8.03 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.90 – 6.88 (m, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.97 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H).

8.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Elucidación estructural de los compuestos **AMCI–V**

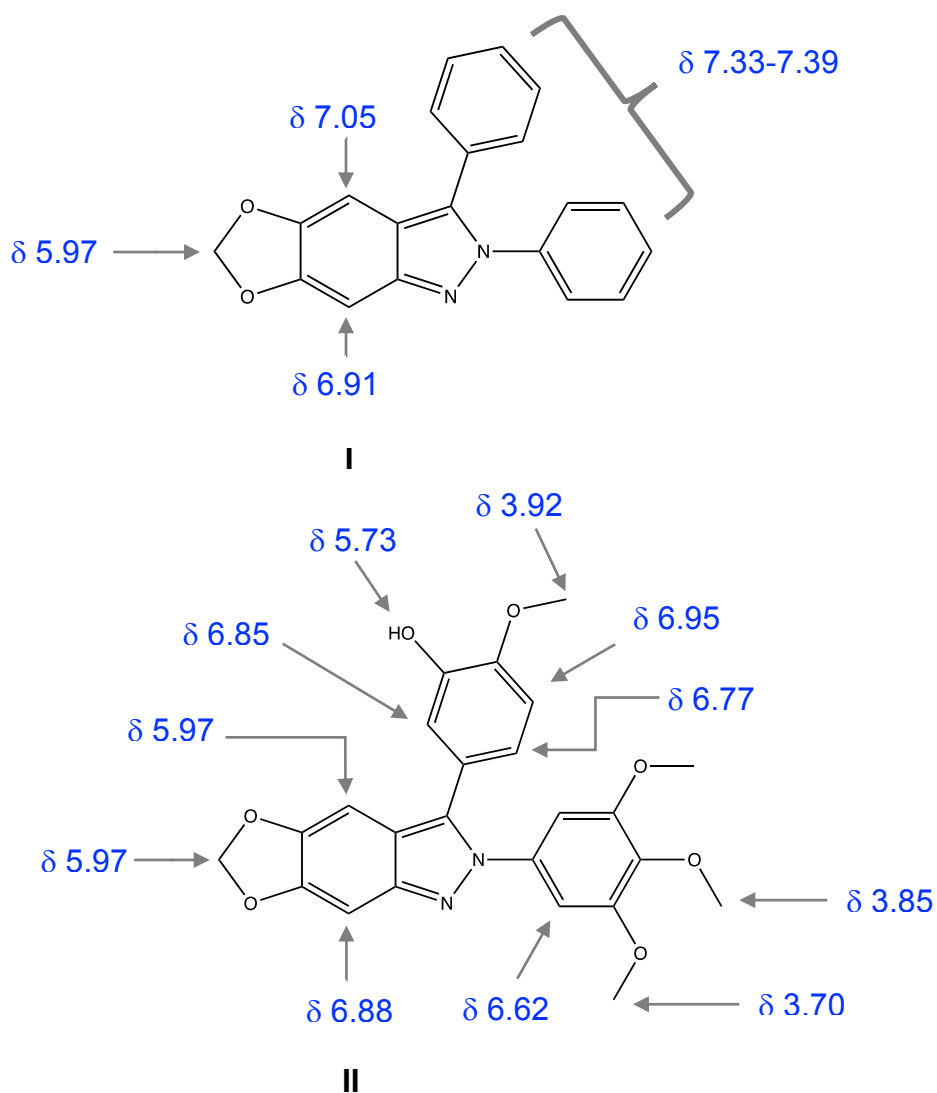
Los compuestos fueron caracterizados por RMN de ^1H observándose las señales esperadas para las estructuras propuestas. Entre las señales encontradas se puede observar en común el singulete que corresponde al metileno de la posición 8 y dos singuletes correspondientes a los protones en posiciones 5 y 11. La asignación de señales se describen en la Tabla 4 y Figura 14 (Espectros RMN, Ver Anexo I)

Tabla 4. Señales generales de RMN de ^1H para los compuestos **AMCI-V**

Estructura	 <p> I: $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^3=\text{R}^4=\text{R}^5=\text{R}^6=\text{H}$ II: $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^3=\text{OCH}_3$, $\text{R}^4=\text{H}$, $\text{R}^5=\text{OCH}_3$, $\text{R}^6=\text{OH}$ III: $\text{R}^1=\text{OH}$, $\text{R}^2=\text{OCH}_3$, $\text{R}^3=\text{H}$, $\text{R}^4=\text{R}^5=\text{R}^6=\text{OCH}_3$ IV: $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{R}^3=\text{H}$, $\text{R}^4=\text{H}$, $\text{R}^5=\text{OCH}_3$, $\text{R}^6=\text{OH}$ V: $\text{R}^1=\text{OH}$, $\text{R}^2=\text{OCH}_3$, $\text{R}^3=\text{R}^4=\text{H}$, $\text{R}^5=\text{OCH}_3$, $\text{R}^6=\text{OH}$ </p>				
Protón	I	II	III	IV	V
H-5	7.05	7.01	6.92	6.94	7.42
H-8	5.97	5.97	5.98	5.94	5.97
H-11	6.91	6.88	7.03	6.86	6.90

Por otro lado las señales obtenidas para los fenilos presentes en las posiciones 2 y 3 del núcleo indazólico se pueden observar tres tipos de combinaciones:

- I. Anillo no sustituido: La mayor parte de las señales se ven traslapadas, por lo tanto se observan multipletes que integran para 10 protones en la molécula AMCI y 5 en el caso de AMCIV
- II. Anillo disustituido: Se observa el patron doble (J -orto), doble de doble (J -orto, -meta) y doble (J -meta) los cuales se marcan para cada estructura en la Figura 14.
- III. Anillo trisustituido: En los compuestos AMCII y AMCIII se observa un singulete en la región con un desplazamiento químico (δ) de 6.85 y 6.50 ppm respectivamente.



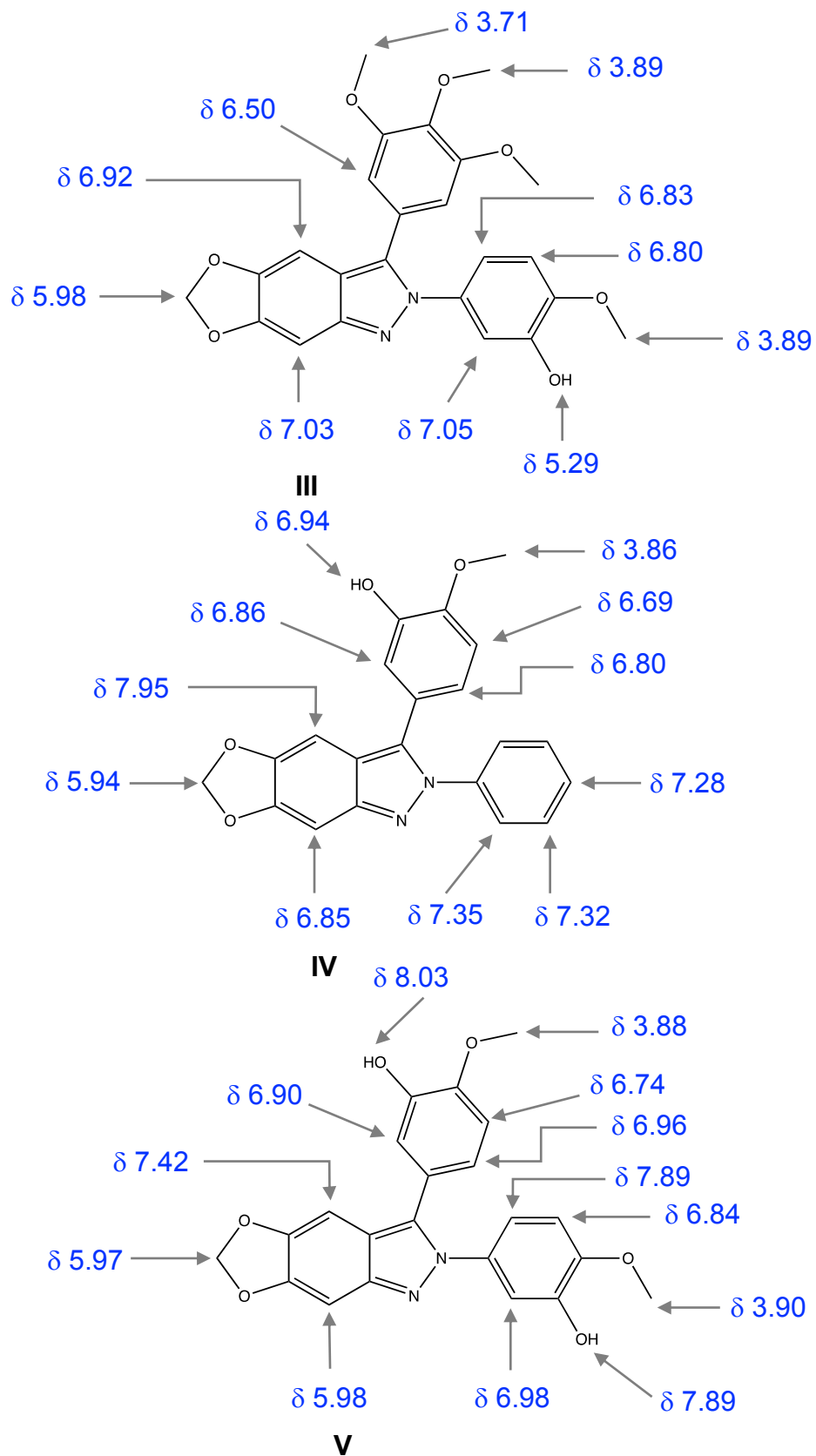


Figura 14. Asignación de señales de los espectros RMN ^1H

8.2 Predicción de propiedades fisicoquímicas

Mediante el uso de la plataforma en línea de SwissADME se calcularon diversos descriptores moleculares de los derivados indazólicos **AMCI-V**, los cuales incluyen: peso molecular (PM), coeficiente de partición (Log *P*), enlaces rotables (ER), donadores de hidrógeno (HBD), aceptores de hidrógeno (HBA) y área polar superficial (tPSA), los cuales son considerados como referentes para predecir la biodisponibilidad de un compuesto. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de los principales descriptores moleculares calculados.

Es importante mencionar que los descriptores moleculares pueden describir características inherentes a la conectividad, grupos funcionales presentes y/o geometría molecular, por lo que nos permiten establecer nexos entre la estructura molecular y su actividad farmacológica de manera cuantitativa (45), por lo que esta información nos permite determinar si una molécula es candidata para ser líder de serie. Los descriptores moleculares evaluados en este trabajo fueron utilizados para determinar si los compuestos cumplen con algunas reglas ampliamente utilizadas como lo son Lipinski, Egan y Veber que nos dan información si una molécula es capaz de exhibir propiedades fisicoquímicas deseables y con ello poseer biodisponibilidad y perfil de seguridad deseados.

Tabla 5. Propiedades moleculares para los compuestos **AMCI-V**

Molécula	PM(g/mol)	Log <i>P</i>	ER	HBD	HBA	tPSA(A ²)
I	314.34	4.00	2	0	3	36.28
II	450.44	3.57	6	1	8	93.43
III	450.44	3.60	6	1	8	93.43
IV	360.36	3.63	3	1	5	65.74
V	406.39	3.27	4	2	7	95.20

Las reglas empleadas establecen ciertos criterios de aceptación para que una molécula presente una absorción o permeación adecuada. La regla de Lipinski dispone un $PM \leq 500$, $HBD \leq 5$, $HBA \leq 10$ y $LogP \leq 5$. Por su parte la regla de Egan sugiere $0 \leq tPSA \leq 132$, $-1 \leq LogP \leq 6$. Finalmente, la regla de Veber indica $ER \leq 10$ y $tPSA \leq 140$. Como se puede observar en la Tabla 5, las moléculas propuestas cumplen de manera satisfactoria con los requisitos de las tres reglas descritas

anteriormente, lo cual sugiere que los derivados planteados tendrán una buena permeabilidad a través de las membranas biológicas y por tanto la capacidad de convertirse en potenciales fármacos. No obstante, es importante mencionar que las reglas empleadas son modelos predictivos que generan aproximaciones, por lo que estos resultados deben de tomarse como resultados preliminares.

8.3 Acoplamiento molecular

Las moléculas propuestas fueron evaluadas como posibles inhibidores de la polimerización de la tubulina llevando a cabo el acoplamiento molecular sobre la interfaz $\alpha\beta$ -tubulina. Se realizaron los cálculos de los derivados **AMCI-V** con los programas *AutoDock Vina*, *AutoDock v4.2* y *GOLD* debido a que nos permiten comparar sus resultados ya que comparten la semejanza de utilizar el algoritmo genético lamarckiano (LGA) que evalúa y clasifica cada una de las poses o conformaciones como cambio de la energía libre, tomando en cuenta una función de campo de fuerza. Para el desarrollo del acoplamiento proteína-ligando se consideró realizarlo de tipo rígido-flexible en la cual se modeló la flexibilidad de los ligandos considerando que tiene un receptor de proteína rígido, de esta manera solo se considera el espacio conformacional del ligando.

Finalmente, los resultados obtenidos de las moléculas propuestas fueron comparadas contra la **CA-4** debido a su característica como agente desestabilizante de la polimerización de los microtúbulos y con ello analizar las moléculas más prometedoras tomando como referencia los valores de score y número de interacciones ligando-receptor obtenidos.

Afinidad sobre el sitio de colchicina

Con los resultados obtenidos se puede analizar las conformaciones obtenidas de los ligandos propuestos para los tres programas en el sitio de unión. En el caso de *AutoDock 4.2* se puede observar que la molécula **AMCIV** posee una orientación similar en los anillos sustituidos que la **CA-4**; por otro lado, las moléculas **AMCIII** y **AMCIV** tomaron una disposición muy cercana del núcleo indazólico ya que casi están superpuestas las estructuras. Finalmente es importante destacar que la

molécula **AMCI** fue la que tomó la orientación más diferente a las demás, siendo esta la no sustituida en los anillos aromáticos.

Para *AutoDock Vina* se puede examinar que en este caso la molécula **AMCII** fue la que compartió mayor semejanza en su posición con relación a la **CA-4**. Las moléculas **AMCI** y **AMCIV** se unieron de una manera más similar, lo cual se puede atribuir a que la única diferencia entre ambas es el patrón de sustitución del fenilo en la posición 3 del indazol.

Por último, en *GOLD* es relevante resaltar que los ligandos **AMCI**, **AMCII**, **AMCIII** y **AMCV** presentaron un acomodo semejante entre sí y una orientación aproximada en el anillo trisustituido de la **CA-4**, es decir, en estas fracciones se acercaron a este modo de unión. La molécula **AMCIV** fue la que presentó mayor diferencia en el acomodo espacial entre todas las estructuras.

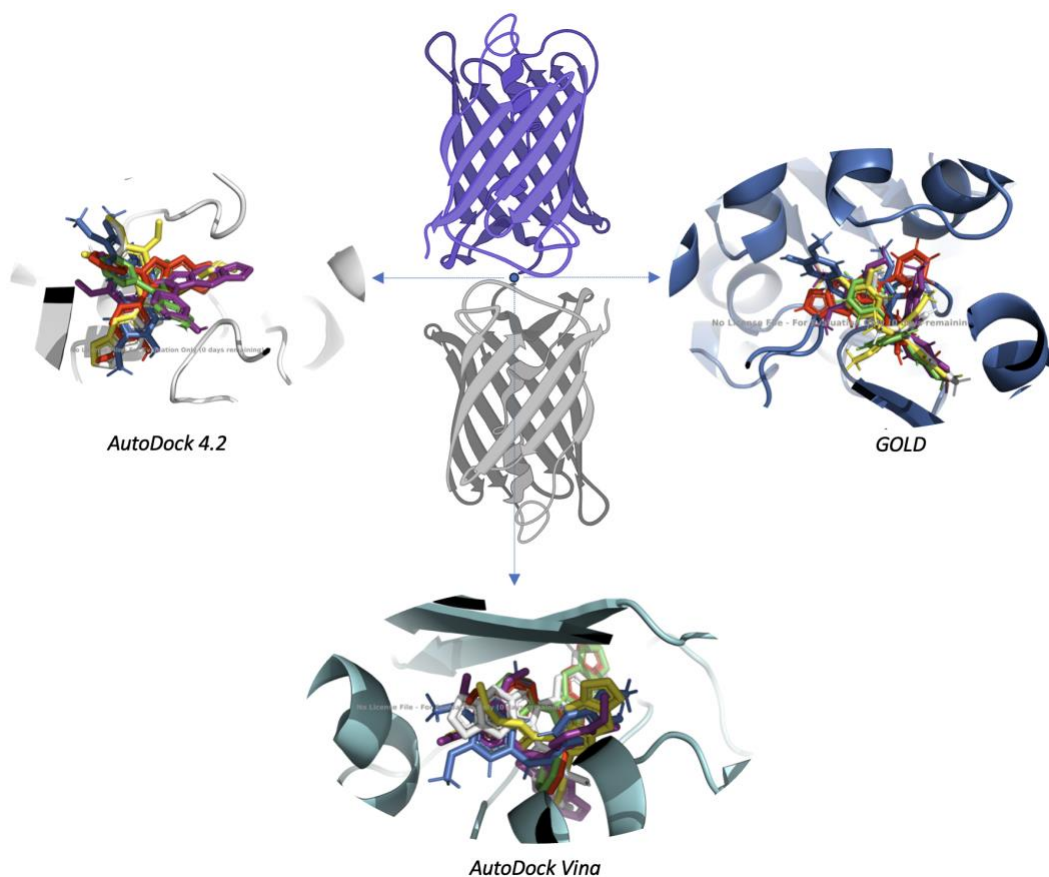


Figura 15. Conformaciones obtenidas del acoplamiento molecular para los derivados indazólicos propuestos **AMCI–V**. **CA-4** (azul), **I** (verde), **II** (morado), **III** (amarillo), **IV** (rojo) y **V** (blanco).

Energía de unión o puntaje de salida

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos por los tres programas de acoplamiento molecular para los derivados indazólicos propuestos **AMCI–V**. Es importante mencionar que los programas *AutoDock 4.2* y *AutoDock Vina* determinan la magnitud de interacción entre el ligando y la proteína mediante la energía libre de unión (ΔG), en donde mientras más negativa sea la puntuación, mejor afinidad presentará el ligando. Por su parte en el software *GOLD* se emplearon dos funciones de puntuación como score (ChemPLP y GoldScore) en las cuales entre mayor sea el puntaje obtenido, mejor calificación tendrá el ligando.

Dicho lo anterior, podemos observar que el ligando **AMCII** fue el que presentó mejores energías de unión en los tres programas, incluso mayor que el compuesto de referencia **CA-4** para el caso de *AutoDock 4.2* y *AutoDock Vina*. Por otro lado, las moléculas **AMCI** y **AMCIII** fueron las siguientes moléculas mejor evaluadas tanto en *AutoDock 4.2* y *AutoDock Vina* lo cual es congruente con los resultados obtenidos previamente por nuestro equipo de investigación; sin embargo el programa *Gold* nos muestra que las moléculas **AMCIV** y **AMCV** podrían ser de interés ya que se obtuvieron scores prometedores, los cuales se contrastarán posteriormente con los resultados biológicos.

Tabla 6. Energías de unión y score ChemPLP GOLD para los compuestos **I–V**

ID	Vina	Autodock 4.2	Gold	
	Energía de unión ΔG (Kcal/mol)	Energía de unión ΔG (Kcal/mol)	ChemPLP score	Gold score
CA-4	-7.8 RMSD=1.19	-8.41 RMSD=0.7	70.51 RMSD=0.98	67.78 RMSD=0.98
I	-6.14	-9.10	50.22	47.78

II	-7.88	-9.25	69.29	66.75
III	-5.82	-8.78	50.76	44.61
IV	-3.75	-8.02	55.18	42.20
V	-4.25	-7.69	54.75	51.32

8.4 Interacciones ligando-receptor

Se llevó a cabo el estudio de las interacciones ligando-receptor, por medio de la comparación de las interacciones reportadas del isómero *cis* de la **CA-4** en el sitio de unión de la colchicina en la tubulina contra los derivados propuestos. En este sentido, es importante mencionar que la **CA-4** estructuralmente posee dos anillos (ver Figura 16). El anillo A está sustituido por tres metoxilos en posiciones 3,4 y 5, mientras que el anillo B por un metoxilo y un grupo hidroxilo en posiciones 4' y 3' respectivamente. Este compuesto se une al sitio de la colchicina en las hebras β S8 y β S9, el bucle β T7, las hélices β H7 y β H8 de la β -tubulina y el bucle α T5 de la α -tubulina de la cual se conocen 17 interacciones de mayor importancia ⁴⁶.

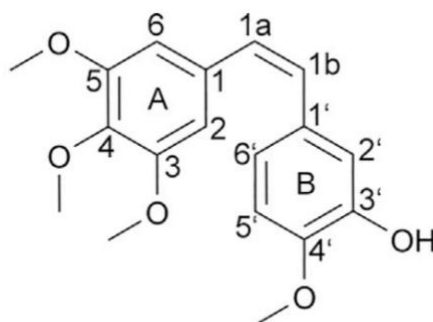


Figura 16. Estructura del isómero *cis* de **CA-4**

El anillo A se encuentra en una cavidad en la cual hay presencia de interacciones hidrófobas con los residuos β Val²³⁸, β Cys²⁴¹, β Leu²⁴², β Leu²⁴⁸, β Ala²⁵⁰, β Leu²⁵⁵, β Ala³¹⁶, β Ile³¹⁸, β Ala³⁵⁴ y β Ile³⁷⁸. Por su parte, el anillo B se ubica entre β Asn²⁵⁸ y β Lys³⁵², el cual se encuentra estabilizado de forma semejante al anillo A, por interacciones de tipo hidrófobas con los residuos α Thr¹⁷⁹, α Ala¹⁸⁰, α Val¹⁸¹, β Met²⁵⁹, β Ala³¹⁶ y β Asn³⁴⁹. Además, es importante destacar la presencia de dos puentes de hidrógeno entre el hidroxilo presente en el anillo B y los residuos α Val¹⁸¹ y α Thr¹⁷⁹

⁴⁶.

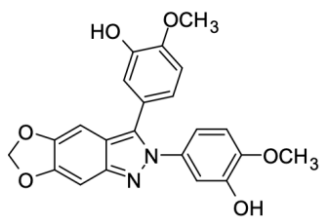
En cuanto a los resultados obtenidos en *AutoDock 4.2*, se puede observar que en la molécula **AMCII** existe la presencia de dos puentes de hidrógeno en el anillo disustituido con los residuos Lys³⁵² en el hidroxilo y Thr³⁵³ con el metoxilo, mientras que en el anillo trisustituido se observan interacciones π -sulfuro con Met²⁵⁹, π -sigma con Leu²⁵⁵ y π -Alkyl con Ala³⁵⁴ e Ile³¹⁸, los cuales también están presentes en la molécula **AMCIV**. Para el caso de la molécula **AMCIII** se aprecian interacciones π -Alkyl con los residuos Ala³⁵⁴, Ile³¹⁸, Ala²⁵⁰, Ile³⁷⁸, Ala³¹⁶ y Leu²⁵⁵ con el anillo trisustituido, las cuales corresponden a las reportadas para la **CA-4** y en cuanto al anillo disustituido comparte la semejanza con la molécula **AMCV**, ya que ambas presentan interacciones π -Alkyl con Lys²⁵⁴, π - π con Leu²⁴⁸; sin embargo, las dos presentan interacciones desfavorables con Leu²⁴⁸ los cuales no permiten una mejor estabilidad ligando-receptor. Asimismo, en las cinco moléculas se presentan diversas interacciones con los sustituyentes en posiciones 5 y 6 del núcleo indazólico con residuos como Lys³⁵², Leu²⁴⁸, Val¹⁸¹, Met²⁵⁹, Ala³¹⁶, Asn³⁵⁰, Ala¹⁸⁰, Lys²⁵⁴. De acuerdo al producto obtenido de esta evaluación las moléculas **AMCII**, **AMCIII** y **AMCIV** fueron las que presentaron mayor similitud de interacciones ligando-receptor comparada con **CA-4** (Figura 17).

Para *Autodock Vina*, en las moléculas **AMCII** y **AMCIII** comparten semejanza en el anillo trisustituido debido a que existen interacciones de tipo π -Alkyl con los residuos Leu²⁴⁸, Ala²⁵⁰, Ile³¹⁸, Ala³⁵⁴, Cys²⁴¹ y Leu²⁵⁵; sin embargo, para la molécula **AMCIII** existe una interacción desfavorable del anillo disustituido con el residuo Thr¹⁷⁹ que en la molécula **AMCII** no está presente, lo cual se refleja de forma significativa en el score obtenido. También se observa la existencia de puentes de hidrógeno en un nitrógeno del núcleo indazólico en el caso de la molécula **AMCI** con el aminoácido Thr¹⁷⁹ y el hidroxilo de un anillo disustituido con Thr³⁵³ para la molécula **AMCV**. También se observa la aparición de interacciones desfavorables tanto en la molécula **AMCIV** (donador desfavorable en el anillo disustituido con Cys²⁴¹) como en la **AMCV** (enlace desfavorable en el anillo aromático del indazol con Leu²⁵⁵) por lo que se infiere que estos son los motivos del por cual son los ligandos peor

evaluados. Las moléculas **AMCII–V** presentaron diversas interacciones con los sustituyentes en posiciones 5 y 6 del núcleo indazólico con residuos como Lys²⁵⁴, Ala³¹⁶, Lys³⁵², Met²⁵⁹, Val¹⁸¹, Asn³⁵⁰, Ile³¹⁸ e Ile³⁷⁸. De acuerdo al producto obtenido de esta evaluación las moléculas **AMCII** y **AMCIII** fueron las que presentaron mayor similitud de interacciones ligando-receptor comparada con **CA-4** (Figura 18).

Finalmente en *GOLD* se puede observar que en la molécula **AMCII** existe la presencia de un puente de hidrógeno del metoxilo y el residuo Arg²²¹, así como un enlace π -azufre del ciclo aromático con Met³²⁵ del anillo disustituido, mientras que en el anillo trisustituido existen múltiples interacciones como π -amida con Val¹⁷⁷, presencia de aceptores de hidrógeno con Gln²⁴⁷ y Pro²²² con dos de los tres metoxilos y π -Alkil con Leu²⁴⁸, Tyr²²⁴, Leu²²⁷ y Val¹⁷⁷, todas ellas proporcionando una mayor estabilidad ligando-receptor en comparación de las demás moléculas. Un aspecto muy importante para mencionar es que en las moléculas **AMCI**, **AMCIII** y **AMCV** existe la presencia de dos puentes de hidrógeno en los oxígenos del 1,3-dioxolano con los residuos Thr³⁵³ y Asn³⁴⁹, a los cuales se les atribuye el buen score obtenido. De acuerdo al producto obtenido de esta evaluación las moléculas **AMCII** y **AMCIII** fueron las que presentaron mayor similitud de interacciones ligando-receptor comparada con **CA-4** (Figura 19).

Como se puede observar en los 3 programas la molécula **AMCII** fue la mejor evaluada ya que presentó el mayor número de interacciones con el heterodímero α/β T, siendo esta la que se ubica de mejor manera en la cavidad hidrofóbica de la proteína al ser estabilizada por la mayoría de los residuos que presenta la **CA-4**. Es relevante destacar que la adición del anillo de 5 miembros colocados en las posiciones 5 y 6 del núcleo indazólico fue favorable ya que se presentaron diferentes interacciones con la proteína, siendo los puentes de hidrógeno en los oxígenos los más representativos, los cuales podrían ser relevantes para mejorar su estabilidad en el sitio de unión y con ello mejorar su actividad antiproliferativa.



AMCV

8 de 17

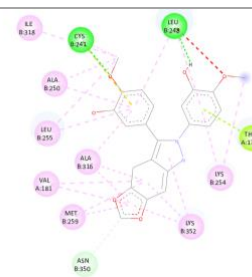
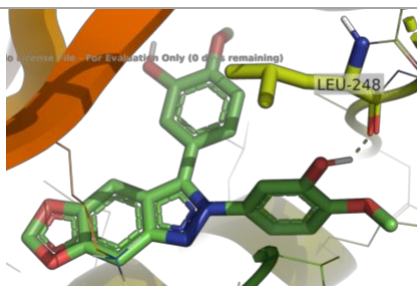
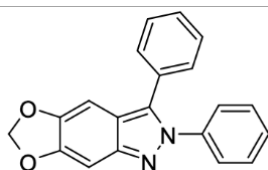


Figura 17. Para *AutoDock 4.2*. Visualización de las moléculas **AMCI-V** y el número de interacciones observadas.

Interacciones

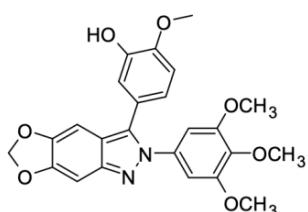
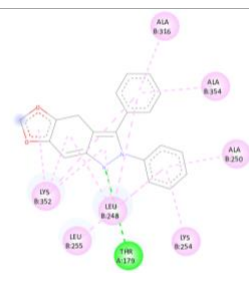
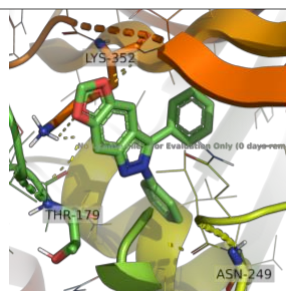
Diagrama 3D

Diagrama 2D



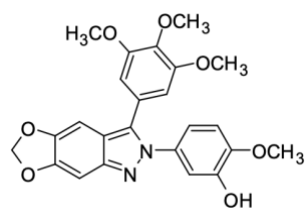
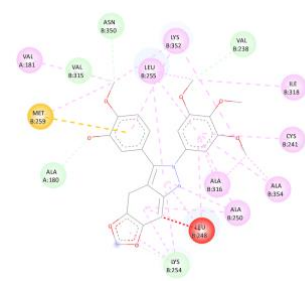
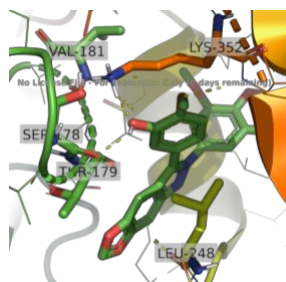
AMCI

7 de 17



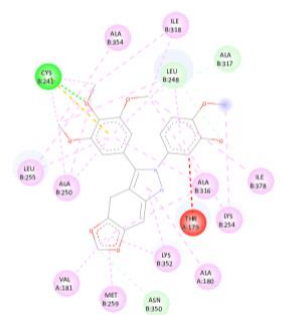
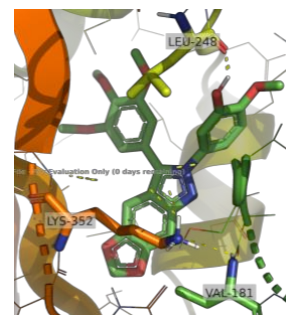
AMCII

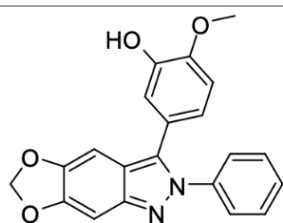
12 de 17



AMCIII

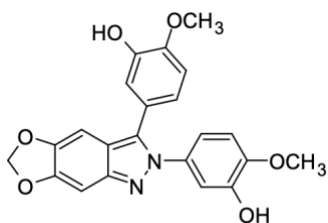
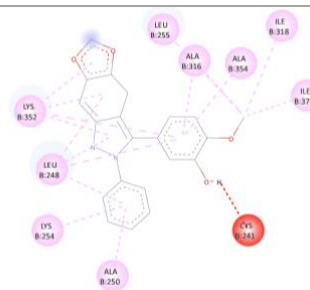
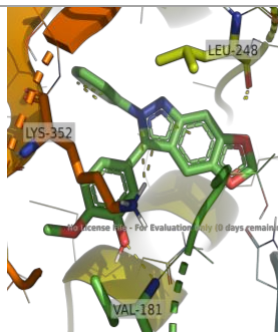
13 de 17





AMCIV

9 de 17



AMCV

8 de 17

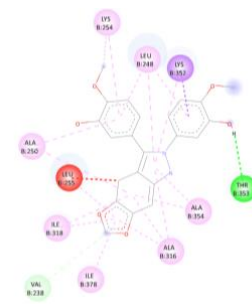
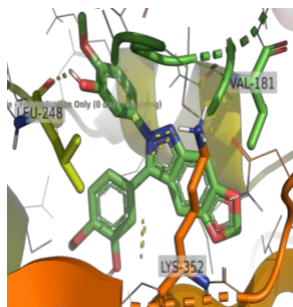
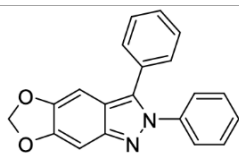


Figura 18. Para *AutoDock Vina*. Visualización de las moléculas **AMCI-V** y el número de interacciones observadas.

Interacciones

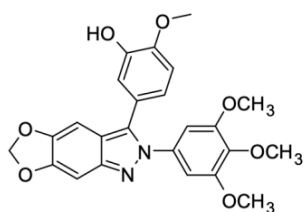
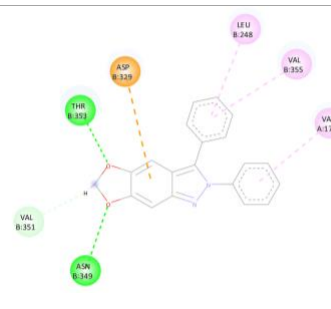
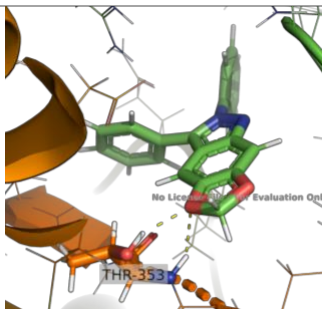
Diagrama 3D

Diagrama 2D



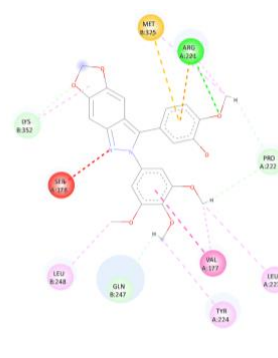
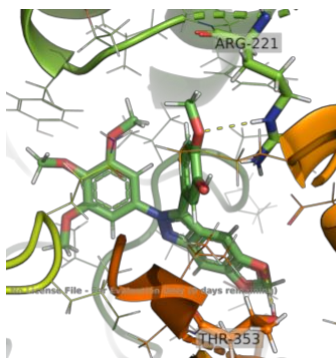
AMCI

2 de 17



AMCII

2 de 17



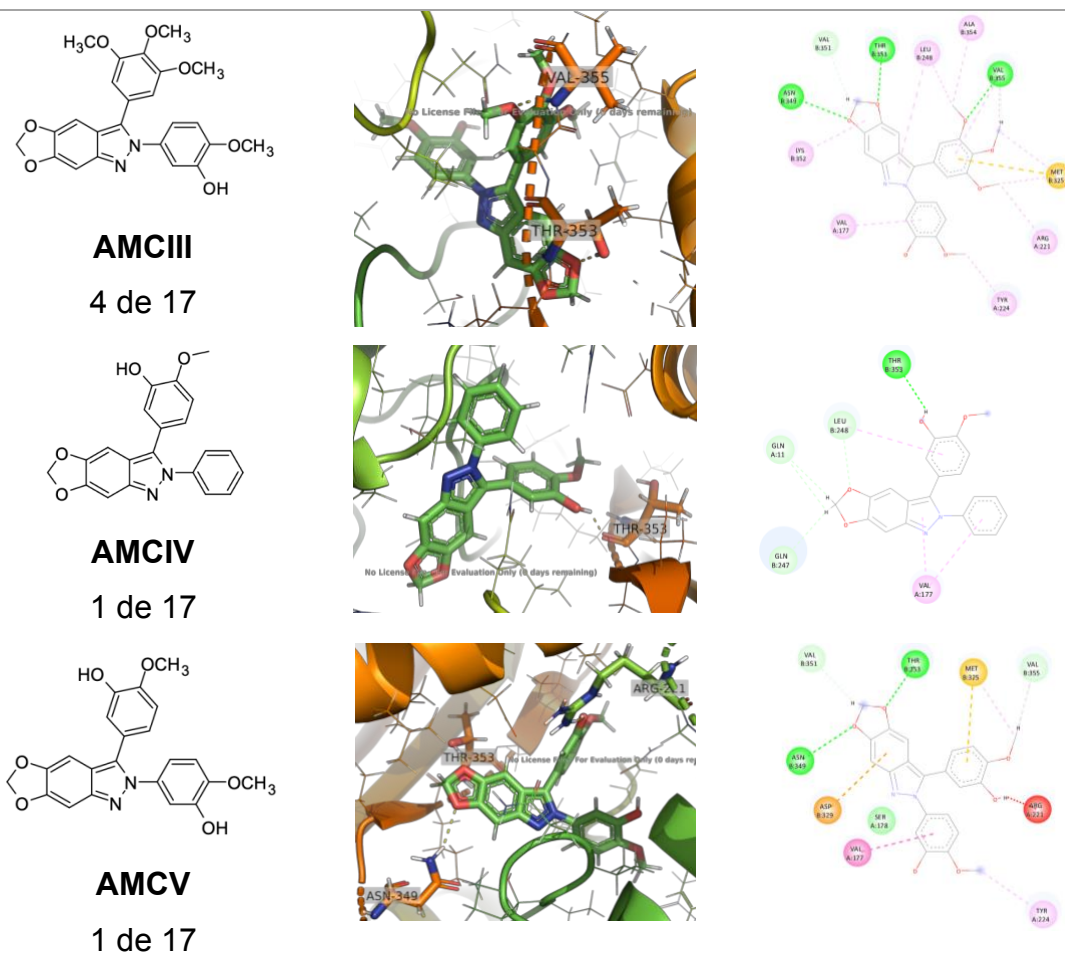


Figura 19. Para *GOLD*. Visualización de las moléculas **AMCI–V** y el número de interacciones observadas.

8.5 Evaluación de la actividad citotóxica

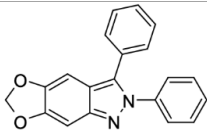
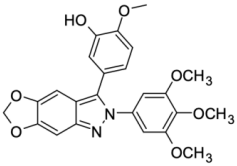
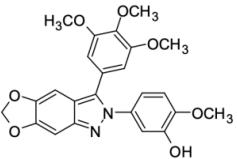
Como se mencionó en el apartado 7.6 de la sección experimental, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento de las células HeLa y SK-LU-1, sin tratamiento y tratadas con los compuestos **AMCI**, **AMCII**, **AMCIII**, **AMCIV** y **AMCV**. Los resultados muestran que los compuestos **AMCII**, **AMCIII** y **AMCV** presentaron mejor actividad antiproliferativa a la concentración evaluada (50 μ M), exhibiendo un porcentaje de inhibición superior al 50% en ambas líneas para el compuesto **AMCII** y en HeLa para los compuestos **AMCIII** y **AMCV** (ver Tabla 7). Un aspecto importante para destacar es que la molécula **AMCI** mostró un efecto citotóxico menos significativo, lo cual nos indica que los sustituyentes en los fenilos son muy importantes, en especial el patrón de sustitución presente en la molécula **AMCII**.

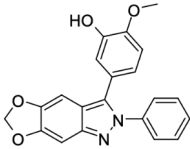
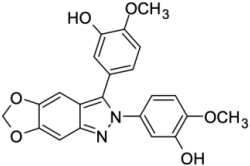
Estos resultados son congruentes a los valores obtenidos en el acoplamiento molecular.

Por otra parte se determinó que la remoción de los sustituyentes del fenilo trisustituido de la molécula **AMCII** impacta de manera significativa la actividad citotóxica como era de esperarse en ambas líneas celulares; sin embargo al añadir los sustituyentes (-OCH₃ en *para* e -OH en *meta*) como en el otro fenilo, se observó una mejora sustancial que incluso supera la actividad biológica observada en la molécula **AMCIII** en ambas líneas, es por ello que se decidió determinar la CI₅₀ (μM) de estas dos moléculas.

Los resultados de las CI₅₀ (μM) mostraron que las moléculas **AMCII** y **AMCV** no presentaron mejor citotoxicidad que la **CA-4**, la cual fue utilizada como referencia, siendo en SK-LU-1 el resultado más destacable para la molécula **AMCII** y en HeLa para la **AMCIII**, mostrando que efectivamente las moléculas son activas (Ver Tabla 8).

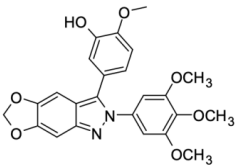
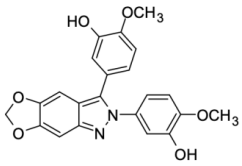
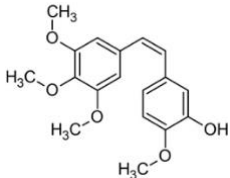
Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular en SK-LU-1 Y HeLa a 50μM

Compuesto	SK-LU-1	HeLa
 AMCI	36.51±0.64	38.97±3.68
 AMCII	64.53±0	62.20±1.52
 AMCIII	33.57±1.59	55.56±2.19

	AMCIV	33.33±1.83	41.65±1.65*
	AMCV	36.19±2.93	57.93±2.40

*Compuestos que precipitan a 50 μ M

Tabla 8. Valores de CI_{50} (μ M) para los compuestos I-V

Compuesto	SK-LU-1	HeLa	
	AMCII	8.23±0.82	26.38±2.40
	AMCV	83.03±3.63	56.37±1.01
	CA-4	0.021±0.002	0.014±0.001

Por otra parte, se evaluaron los cambios morfológicos de las líneas celulares HeLa y SK-LU-1 con el tratamiento de las moléculas propuestas **AMCI–V**. En la Figura 20 se muestra el efecto comparativo de las células tratadas con el control positivo (**CA-4**) a 50 μ M y el control negativo; es decir sin tratamiento. Como se puede observar en el control negativo, en ambas líneas se aprecia una monocapa de células de morfología poligonal fuertemente adheridas; en contra parte se encontró que las células con tratamiento redujeron significativamente su viabilidad celular ya que se observaron células de complejión redonda, por lo que es evidente la pérdida de

adhesión y de la monocapa, las cuales son características de su morfología clásica, lo cual demuestra la alta citotoxicidad de la **CA-4** en ambas líneas celulares.

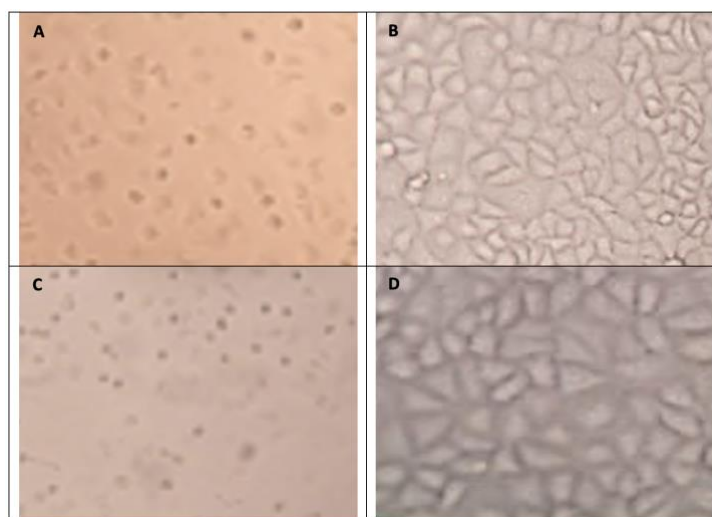


Figura 20. Microscopia de campo claro para células HeLa tratadas con **CA-4** (A) y sin tratamiento (B); células SK-LU-1 tratadas con **CA-4** (C) y sin tratamiento (D).

En la Figura 21 se presenta un análisis comparativo del efecto de los compuestos **AMCII** y **AMCV** a una concentración cercana a su correspondiente CI_{50} determinada previamente sobre las líneas celulares evaluadas. En ambas líneas es notorio el efecto inducido por los compuestos; sin embargo, es más evidente el cambio en el caso de la molécula **AMCII** ya que la estructura celular se ve más comprometida al presentar mayor número de células de morfología redonda, aunque en ambas es evidente el daño por la indudable pérdida de la monocapa.

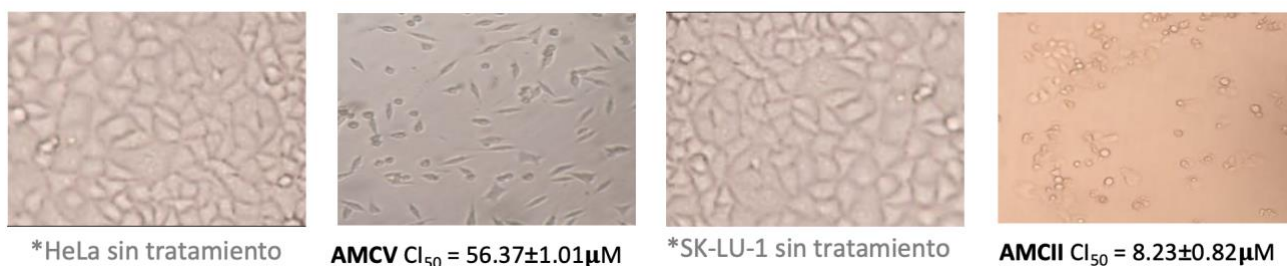


Figura 21. Microscopía de células *SK-LU-1* y *HeLa* tratadas con los compuestos **AMCII** y **AMCV** a 12.5 y 50 μM respectivamente

9. CONCLUSIONES

Se estudiaron nuevos derivados de las moléculas **JPINAPP09** y **JPINAPP18** evaluados previamente por nuestro grupo de trabajo con afinidad sobre la interfaz α/β -tubulina por medio de programas de acoplamiento molecular

Se lograron sintetizar las cinco moléculas propuestas, además de caracterizarlas de forma satisfactoria mediante RMN de ^1H .

Estudios de acoplamiento molecular indican que las moléculas diseñadas **AMCI-V** se unen al sitio de unión de la combretastatina.

Se realizó la evaluación de la actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer HeLa y SK-LU-1 encontrando las moléculas **AMCII** y **AMCV** con mejor actividad citotóxica.

Los resultados de acoplamiento molecular y de evaluación biológica muestran que los sustituyentes en los fenilos son muy importantes, en especial el patrón de sustitución presente en la molécula **AMCII**, ya que es donde se observa un mejor acomodo en la interfaz α/β -tubulina lo cual se refleja en una mayor actividad citotóxica.

Las moléculas propuestas no presentaron mayor potencia que la molécula **JPINAPP09** lo cual nos indica que los sustituyentes añadidos en las posiciones 5 y 6 no mejoraron la afinidad a la proteína; sin embargo, si se logró mejorar la actividad de la molécula **JPINAPP18** en ambas líneas celulares, ya que el compuesto **AMCII** produjo un CI_{50} de 8.23 ± 0.82 en SK-LU-1 y 22.38 ± 2.40 en HeLa, superiores a las reportadas para **JPINAPP18**, por lo que es de interés continuar con su estudio.

10. PERSPECTIVAS

Es importante analizar y evaluar con diferentes modificaciones estructurales y de nuevos sustituyentes en las posiciones 5 y 6 del núcleo indazólico, ya que aún existe la oportunidad de aprovechar la cavidad existente cercana al sitio de unión de la colchicina, entre el compuesto híbrido **JPINAPP09** y la interfaz α/β -tubulina.

Mejorar la ruta de síntesis y purificación, debido a la generación de múltiples subproductos que limitan la obtención los compuestos deseados en buenos rendimientos.

11. REFERENCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Mohar-Betancourt A, Reynoso-Noverón N, Armas-Texta D, Gutiérrez-Delgado C, Torres-Domínguez JA. Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *J Glob Oncol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Feb 10];3(6):740. Available from: </pmc/articles/PMC5735971/>
3. Debela DT, Muzazu SGY, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med* [Internet]. 2021 Aug 12 [cited 2024 Feb 10];9. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/20503121211034366>
4. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 10];7(3):339. Available from: </pmc/articles/PMC5651054/>

-
5. Anand U, Dey A, Singh Chandel AK, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. [cited 2024 Feb 10]; Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
 6. Dong J, Zhang Q, Wang Z, Huang G, Li S. Recent Advances in the Development of Indazole-based Anticancer Agents. *ChemMedChem* [Internet]. 2018 Aug 10 [cited 2024 Feb 12];13(15):1490–507. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.201800253>
 7. D. Katsetos C, Draber P. Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2012 Sep 10 [cited 2024 Feb 12];18(19):2778–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22390762/>
 8. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 13];22(12):3855–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29949179/>
 9. Hausman DM. What Is Cancer? *Perspect Biol Med* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2024 Feb 13];62(4):778–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31761807/>
 10. Role of Genetics in Cancer. *Cancer, a formidable adversary to human... | by Continental Hospitals | Medium* [Internet]. [cited 2024 Feb 15]. Available from: <https://medium.com/@continentalhyd/role-of-genetics-in-cancer-155cfd120cf4>
 11. Brau-Figueroa H, Palafox-Parrilla EA, Mohar-Betancourt A, Brau-Figueroa H, Palafox-Parrilla EA, Mohar-Betancourt A. El Registro Nacional de Cáncer en México, una realidad. *Gaceta mexicana de oncología* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2024 Feb 14];19(3):107–11. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2565-005X2020000300107&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 12. COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 77/23 2 DE FEBRERO DE 2023 PÁGINA 1/6 COMUNICACIÓN SOCIAL ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA

MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) DATOS NACIONALES.
[cited 2024 Feb 14]; Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

13. Cancer Today [Internet]. [cited 2024 Feb 15]. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&types=0&sexes=0&populations=484>
14. Baudino T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol* [Internet]. 2015 Aug 4 [cited 2024 Feb 15];12(1):3–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26033233/>
15. Zaimy MA, Saffarzadeh N, Mohammadi A, Pourghadamyari H, Izadi P, Sarli A, et al. New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Feb 15];24(6):233–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28574057/>
16. Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Von Hoff DD. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 Jan 15 [cited 2024 Feb 15];24(2):266–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28765323/>
17. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2010 [cited 2024 Feb 19];9(10):790–803. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20885410/>
18. Cui W, Aouidate A, Wang S, Yu Q, Li Y, Yuan S. Discovering Anti-Cancer Drugs via Computational Methods. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 May 20 [cited 2024 Feb 19];11. Available from: [/pmc/articles/PMC7251168/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/347251168/)
19. de Araújo RSA, da Silva-Junior EF, de Aquino TM, Scotti MT, Ishiki HM, Scotti L, et al. Computer-Aided Drug Design Applied to Secondary Metabolites as Anticancer Agents. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2020 Jun 7 [cited 2024 Feb 20];20(19):1677–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32515312/>

-
20. Medina-Franco JL, Fernández-de Gortari E, Naveja JJ, Medina-Franco JL, Fernández-de Gortari E, Naveja JJ. Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación química* [Internet]. 2015 Jul 31 [cited 2024 Feb 21];26(3):180–6. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2015000300180&lng=es&nrm=iso&tling=es
 21. Yu W, Mackerell AD. Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 21];1520:85–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27873247/>
 22. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2024 Feb 24];20(7):13384–421. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26205061/>
 23. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2024 Feb 23];20(18). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31487867/>
 24. Bukhari SNA, Kumar GB, Revankar HM, Qin HL. Development of combretastatins as potent tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Chem* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Mar 2];72:130–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28460355/>
 25. Nieuwenhuis J, Brummelkamp TR. The Tubulin Detyrosination Cycle: Function and Enzymes. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2024 Feb 29];29(1):80–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30213517/>
 26. Shemesh A, Ginsburg A, Levi-Kalisman Y, Ringel I, Raviv U. Structure, Assembly, and Disassembly of Tubulin Single Rings. *Biochemistry* [Internet]. 2018 Oct 30 [cited 2024 Feb 28];57(43):6153–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30247898/>
 27. Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 1997 [cited 2024 Mar 5];13:83–117. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9442869/>

-
28. Cassimeris LU, Walker RA, Pryer NK, Salmon ED. Dynamic instability of microtubules. *Bioessays* [Internet]. 1987 [cited 2024 Mar 4];7(4):149–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3318820/>
 29. Horio T, Murata T, Murata T. The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front Plant Sci* [Internet]. 2014 Oct 7 [cited 2024 Mar 5];5(OCT). Available from: [/pmc/articles/PMC4188131/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264188131/)
 30. Nami B, Wang Z. Genetics and Expression Profile of the Tubulin Gene Superfamily in Breast Cancer Subtypes and Its Relation to Taxane Resistance. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2018 Aug 18 [cited 2024 Mar 11];10(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126203/>
 31. Pasquier E, Kavallaris M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life* [Internet]. 2008 [cited 2024 Mar 11];60(3):165–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18380008/>
 32. Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2024 Mar 11];28(10):776–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29871823/>
 33. Coulup SK, Georg GI. Revisiting microtubule targeting agents: α -Tubulin and the pironetin binding site as unexplored targets for cancer therapeutics. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Mar 11];29(15):1865–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31130264/>
 34. Field JJ, Díaz JF, Miller JH. The binding sites of microtubule-stabilizing agents. *Chem Biol* [Internet]. 2013 Mar 21 [cited 2024 Mar 15];20(3):301–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23521789/>
 35. Pérez-Villanueva J, Matadamas-Martínez F, Yépez-Mulia L, Pérez-Koldenkova V, Leyte-Lugo M, Rodríguez-Villar K, et al. Synthesis and Cytotoxic Activity of Combretastatin A-4 and 2,3-Diphenyl-2 H-indazole Hybrids. *Pharmaceuticals (Basel)* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Mar 23];14(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34451912/>
 36. Lucero Ruiz Garcia J, Francisco Cortés Benítez J. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

-
37. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2024 Mar 30];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28256516/>
 38. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* [Internet]. 2012 Aug [cited 2024 Mar 31];4(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22889332/>
 39. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* [Internet]. 2009 Dec [cited 2024 Mar 31];30(16):2785–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399780/>
 40. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2024 Mar 31];28(1):235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10592235/>
 41. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* [Internet]. 2004 Oct [cited 2024 Mar 31];25(13):1605–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15264254/>
 42. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2010 Jan 30 [cited 2024 Apr 1];31(2):455–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19499576/>
 43. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* [Internet]. 1997 Apr 4 [cited 2024 Apr 1];267(3):727–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9126849/>
 44. 2-PHENYLINDAZOLE. *Organic Syntheses*. 1968;48:113.

-
45. Goode-Romero G, Aguayo-Ortiz R, Domínguez L, Goode-Romero G, Aguayo-Ortiz R, Domínguez L. Relaciones cuantitativas estructura-actividad/propiedad en dos dimensiones empleando el programa R. *Educación química* [Internet]. 2019 Apr 9 [cited 2024 Apr 23];30(2):27–40. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2019000200027&lng=es&nrm=iso&tlng=es
46. Gaspari R, Prota AE, Bargsten K, Cavalli A, Steinmetz MO. Structural Basis of cis- and trans-Combretastatin Binding to Tubulin. *Chem*. 2017 Jan 12;2(1):102–13.

12. ANEXO I

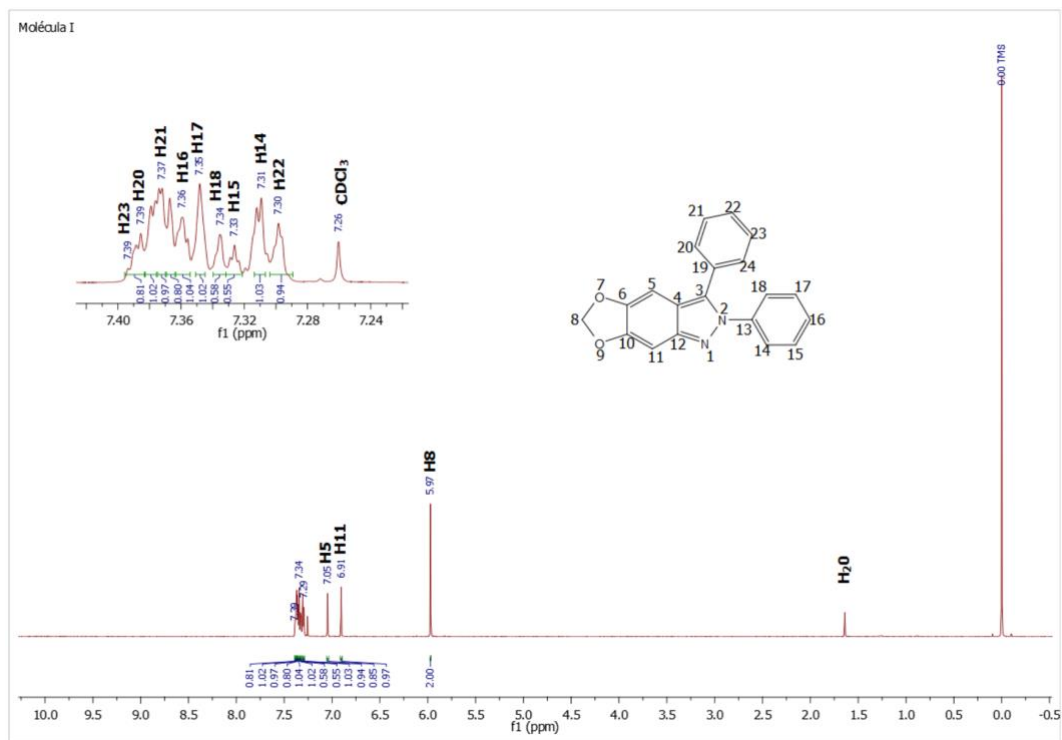


Figura 22. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto **AMCI**

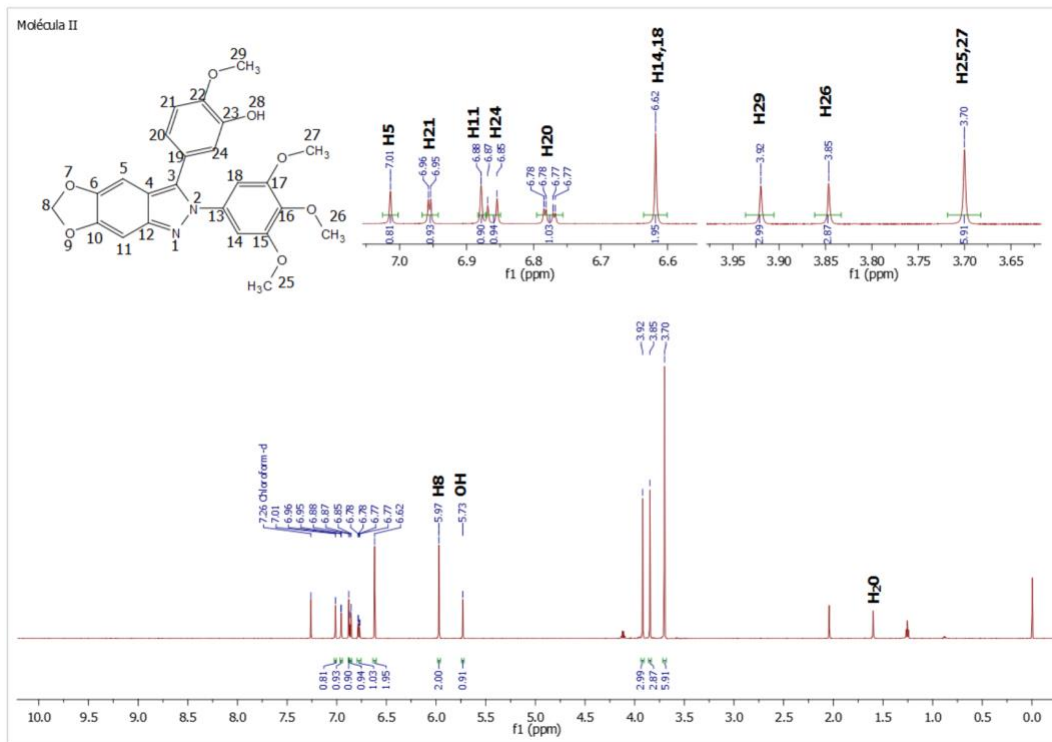


Figura 23. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto **AMCII**

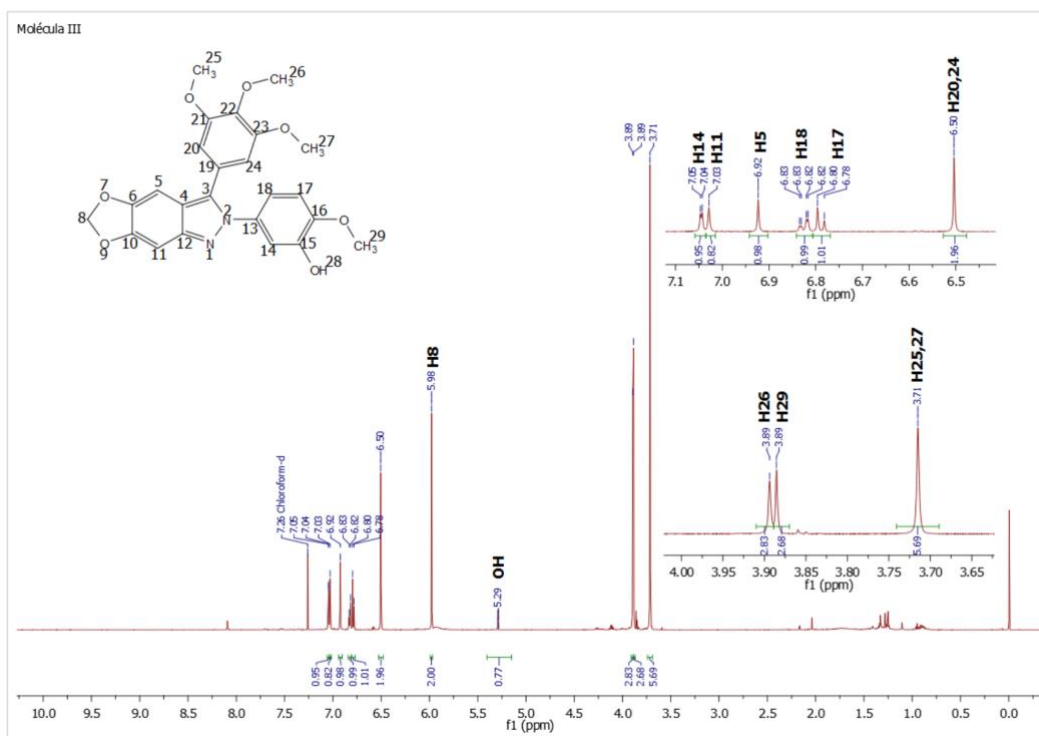


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto **AMCIII**

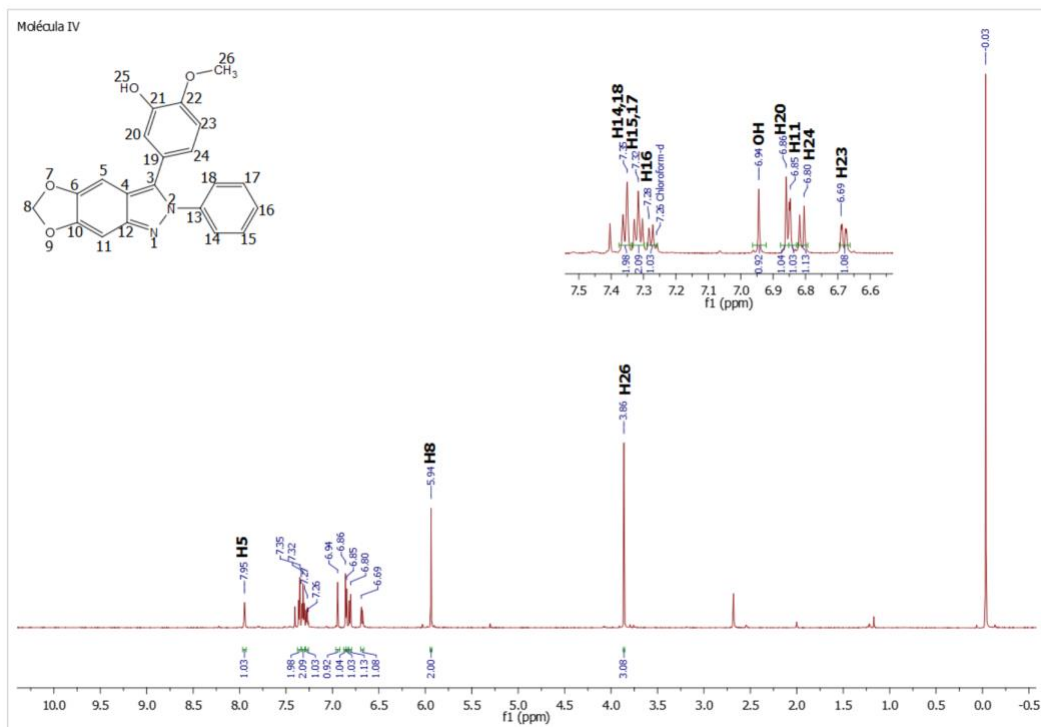


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto **AMCIV**

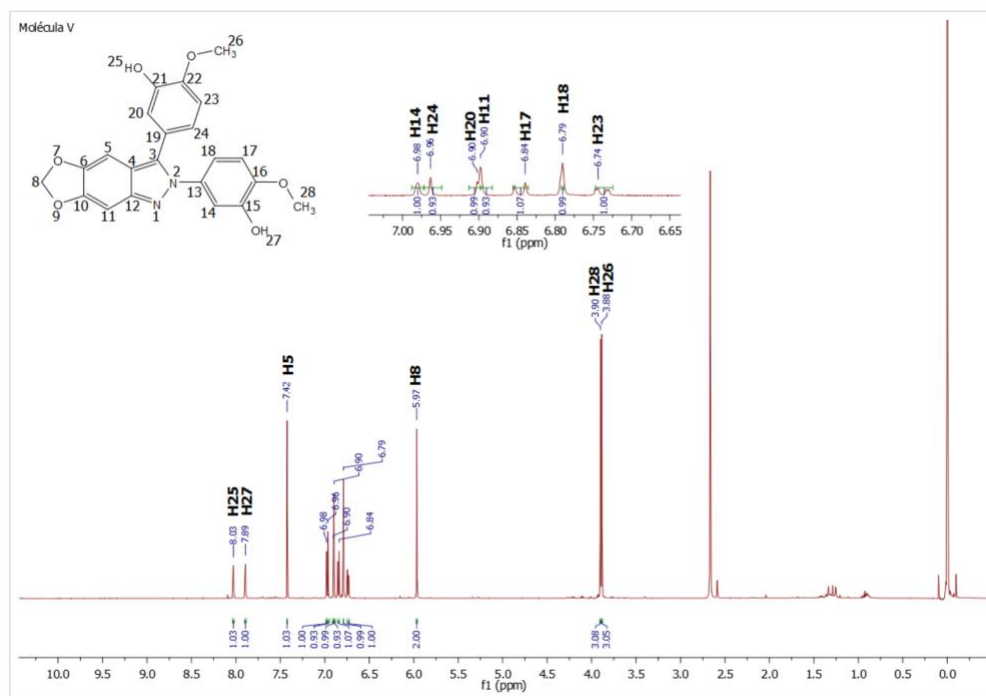


Figura 26. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto AMCV