



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe final de investigación de servicio social

Síntesis de derivados de 2H-indazol como potenciales citotóxicos con mecanismo de acción dual sobre ciclooxigenasa-2 y tubulina

Presenta

Dávila Paz María José

2202029983

Asesores

Dr. Jaime Pérez Villanueva
Profesor Titular C de TC
No. Económico:35386

Dra. Karen Rodríguez Villar
Asesor Externo
No. de célula: 10952378

Fecha de inicio y termino: 9 de febrero a 9 de agosto de 2024 (6 meses)

Resumen

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anómalas en el organismo. Estas células tienen la capacidad de infiltrarse en los tejidos corporales sanos causando metástasis.¹ Según la Organización Mundial de la Salud, la metástasis es la principal causa de muerte por cáncer. Dada la incidencia y la gravedad del cáncer, se utilizan distintos tipos de tratamientos contra el cáncer, los más habituales son: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, en la cual por medio de fármacos citotóxicos se busca eliminar células anómalas.

Sin embargo, existen casos de resistencia a los fármacos convencionales y efectos adversos, creando una necesidad constante de nuevas moléculas bioactivas que puedan ser desarrolladas como alternativas terapéuticas. Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se identificaron moléculas derivadas de *2H*-indazol que tienen como blancos terapéuticos a la ciclooxigenasa-2 y tubulina, ambas proteínas tienen funciones importantes dentro de la célula. Por un lado, se ha demostrado que los compuestos que interfieren en la polimerización de la tubulina promueven la muerte celular por apoptosis y algunos de ellos tienen aplicación clínica en el tratamiento de algunos tipos de cáncer; mientras que los inhibidores selectivos de COX-2 han demostrado utilidad en una condición denominada poliposis adenomatosa familiar, que se caracteriza por la aparición de pólipos que son bultos anormales que pueden convertirse en cáncer.²

En el presente trabajo se obtuvieron cuatro compuestos derivados de *2H*-indazol empleando la síntesis orgánica, los compuestos fueron caracterizados por su punto de fusión, factor de retención y por RMN ¹H. Por otro lado, se realizó el acoplamiento molecular de dichas moléculas en ambos blancos terapéuticos, mostrando una mejor afinidad por la ciclooxigenasa-2, dicho resultado es favorable para continuar con el estudio de dichas moléculas.

Agradecimientos

A Ericka Paz López, mi madre, gracias por siempre estar para mí, darme amor, comprensión y consuelo. Gracias por todo el trabajo que has realizado durante años para darme siempre lo mejor, eres mi motor para siempre seguir adelante, este logro no solo es mío, sino también tuyo. Te amo mamá.

A Carlos de Jesús Limón Gutiérrez, gracias por todos los conocimientos que me has compartido, por la paciencia y sobre todo por los buenos momentos que hemos tenido en el laboratorio, gracias a tu apoyo este proyecto fue posible, te quiero.

A Jaime Pérez Villanueva, mi asesor, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y haberme permitido experimentar, a pesar de mi inexperiencia, gracias por todas esas charlas que hemos compartido y que me han inspirado a seguir adelante.

A Karen Rodríguez Villar, mi asesora, gracias por darme la oportunidad de entrar al laboratorio de síntesis, por todo lo que me ha enseñado, por la paciencia, comprensión y tenía razón, la síntesis es mucha talacha. La admiro.

A María José Davila, su servidora, lo has logrado, no fue un camino fácil, te vas con muchas buenas experiencias y conocimientos. Pero, sobre todo, con el alma feliz porque conociste personas muy lindas en el laboratorio quienes ya ocupan un lugar especial en tu corazón.

Gracias Laboratorio N-015

Índice

Resumen	2
Agradecimientos	3
1. Introducción	6
2. Antecedentes.....	6
2.1 Cáncer	6
2.2 Quimioterapia	7
2.3 Ciclooxigenasa	7
2.4 Tubulina	8
2.5 Compuestos bioactivos con núcleo indazol	10
3. Planteamiento del problema y justificación	12
4. Objetivos.....	12
4.1 Objetivo general	12
4.2 Objetivos específicos.....	13
5. Metodología.....	13
5.1 Ruta general de síntesis para los compuestos MDP-1 a MDP-4	13
5.1.1. Síntesis de intermediarios 2-fenil-2 <i>H</i> -indazol (1a , 1b , 1c)	14
5.1.1.3. 4-(6-Cloro-2 <i>H</i> -indazol-2-il)benzoato de metilo (1c)	14
5.1.2. Síntesis de intermediarios 3-bromo-2-fenil-2 <i>H</i> -indazol (2a , 2b , 2c).....	15
5.1.2.1. 4-(3-Bromo-2 <i>H</i> -indazol-2-il)benzoato de metilo (2a).....	15
5.1.2.2. 4-(3-Bromo-6-(trifluorometil)-2 <i>H</i> -indazol-2-il)benzoato de metilo (2b)	15
5.1.2.3. 4-(3-Bromo-6-cloro-2 <i>H</i> -indazol-2-il)benzoato de metilo (2c).....	15
5.1.3. Síntesis de los compuestos finales MDP-1 , MDP-3 y MDP-4	15
5.1.3.1. 4-(3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2 <i>H</i> -indazol-2-il) benzoato de metilo (MDP-1) .	16
5.1.3.2. 4-(3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-6-(trifluorometil)-2 <i>H</i> -indazol-2-il) benzoato de metilo (MDP-3).....	16
5.1.3.3. 4-(6-Cloro-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2 <i>H</i> -indazol-2-il) benzoato de metilo (MDP-4)	16
5.2 Evaluación por acoplamiento molecular sobre ciclooxigenasa-2 y tubulina	17
5.2.1 Preparación de los ligandos	17
5.2.2 Validación y acoplamiento molecular	17
6. Resultados y discusión	18
6.1 Síntesis orgánica.....	18
6.2 Elucidación estructural de los compuestos finales	18

6.3 Acoplamiento molecular	20
6.3.1. Acoplamiento molecular sobre tubulina.....	20
6.3.2. Acoplamiento molecular sobre ciclooxygenasa-2.....	22
7. Conclusiones	24
8. Referencias	25
9. Anexos	26

1. Introducción

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anómalas en el organismo. Estas células se infiltran en los tejidos corporales sanos, propagándose y pudiendo causar metástasis.¹ Uno de los tratamientos más usados contra el cáncer es la quimioterapia, en la que por medio de fármacos citotóxicos se busca eliminar a las células cancerosas. Sin embargo, existen casos de resistencia a los fármacos convencionales y efectos adversos, creando una necesidad constante de nuevas moléculas bioactivas que puedan ser desarrolladas como alternativas terapéuticas. Recientemente, en nuestro grupo de investigación, se identificaron moléculas derivadas de *2H*-indazol que tienen como blancos terapéuticos a la ciclooxigenasa-2 y tubulina. Se ha demostrado que la inhibición de estos blancos favorece que algunos tipos de tumores dejen de propagarse o disminuyan su tamaño.² Por ello, en la presente investigación se realizó la síntesis, la caracterización y el acoplamiento molecular de nuevas moléculas derivadas de *2H*-indazol dirigidas a la inhibición de la ciclooxigenasa-2 y tubulina, con la finalidad de explorar a estas nuevas moléculas y aportar al estudio de dichos derivados.

2. Antecedentes

2.1 Cáncer

El cuerpo humano está compuesto por millones de células que en condiciones normales crecen, se dividen para generar células nuevas y después mueren. Sin embargo, cuando se presenta una alteración y se desarrolla una enfermedad como el cáncer, las células continúan creciendo y formando nuevas células de manera descontrolada, pudiendo propagarse a otros tejidos. Debido a este crecimiento descontrolado, estas células forman una masa de tejido anormal, llamada tumor, que suelen clasificarse como benignos o malignos.³

Los tumores benignos (no cancerosos) son masas que crecen en una zona localizada del cuerpo y no pueden invadir otras partes, sin embargo, son peligrosos si oprimen órganos importantes o pueden convertirse en cancerosos. Mientras, los tumores malignos (cancerosos) suelen invadir tejidos cercanos, o diseminarse a otros sitios del cuerpo por medio del sistema linfático o la sangre, formando un tumor en otra parte del cuerpo, es decir, produciendo metástasis.⁴

Según la Organización Mundial de la Salud, la metástasis es la principal causa de muerte por cáncer. Dada la incidencia y la gravedad del cáncer, se utilizan distintos tipos de

tratamientos, los más habituales son: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, siendo esta última la más utilizada.⁵

2.2 Quimioterapia

Es un tratamiento en el cual se administran fármacos citotóxicos o antineoplásicos con el fin de evitar que las células cancerosas se multipliquen, invadan otros tejidos y hagan metástasis.⁶ Los fármacos citotóxicos más utilizados pueden dividirse en dos grupos dependiendo su diana terapéutica. El primer grupo está conformado por fármacos que interfieren en la biosíntesis del ADN, es decir, inhibiendo su síntesis o introduciendo alteraciones en él. El segundo grupo está conformado por fármacos que interfieren en la división celular, inhibiendo la proliferación acelerada de las células cancerosas e induciendo apoptosis que conlleva a la muerte celular.⁷

Estos fármacos circulan por todo el cuerpo y ejercen su efecto citotóxico en la célula por medio de la inducción de la apoptosis, causando daños irreversibles tanto en las células cancerosas como en las células normales. La causa de los principales efectos secundarios es el daño que ocasionan a las células normales, siendo más propensas a sufrir daño aquellas que producen sangre en la médula ósea, los folículos pilosos (raíces del pelo), células en la boca, tracto digestivo y células sexuales.⁸

En los últimos años se han incorporado a los tratamientos disponibles nuevos fármacos denominados agentes biológicos diana-específicos, fármacos antidiana o terapias dirigidas, dichos fármacos reconocen las características específicas de las células tumorales, actuando directamente sobre proteínas o mecanismos implicados en la proliferación y crecimiento de estas células, y que constituyen una parte fundamental en el desarrollo de la célula tumoral. El objetivo de estos fármacos es bloquear dianas específicas de las células cancerosas para retardar o detener el crecimiento del cáncer, siendo más específicos y produciendo menos efectos secundarios.⁸

Por ello, en la presente investigación se proponen como blancos terapéuticos a la ciclooxigenasa-2 y tubulina, que se ha demostrado que la inhibición de estos blancos favorece que los tumores dejen de propagarse o disminuyan su tamaño.²

2.3 Ciclooxigenasa

Es una enzima importante para la síntesis de prostaglandinas mediante la oxidación del ácido araquidónico. Las prostaglandinas cumplen con diversas funciones en el organismo principalmente asociadas con el dolor y la inflamación.⁹

Existen dos isoformas de la ciclooxigenasa: COX-1 y COX-2. Dichas isoformas presentan una afinidad similar por el ácido araquidónico y son homólogas en un 90%. Sin embargo, presentan diferente afinidad por el sustrato y se encuentran en distintos lugares de la célula. La COX-1 es importante para la síntesis de los prostanoïdes para funciones fisiológicas y también para regular funciones como: la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la hemodinámica renal y la función plaquetaria. En la célula, la COX-1 se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplasmático. Aunque se expresa constitutivamente en varios tejidos, sus valores cambian durante el desarrollo.⁹

La COX-2 no se encuentra presente de manera natural en la célula, aparece de manera espontánea cuando la célula está expuesta a distintas sustancias. Es la encargada de regular la producción de prostanoïdes que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos. Su expresión aumenta en respuesta a citocinas, factores de crecimiento y mitógenos. Esta se encuentra en la región perinuclear y en la membrana nuclear.⁹

Algunos inhibidores selectivos de la COX-2 inducen apoptosis mediante diversos mecanismos como el aumento de ácido araquidónico, el cual estimula la conversión de esfingomielina a ceramida (mediador de la apoptosis), o bien, a través de la alteración de la producción de prostaglandinas y de la disminución de factores angiogénicos.

2.4 Tubulina

Es una proteína globular dimérica de las células eucariotas formada por dos subunidades: tubulina α y tubulina β (Figura 1). Los dímeros de la tubulina se unen de manera longitudinal formando hebras (protofilamento), las cuales a su vez forman microtúbulos, que en conjunto con los microfilamentos de actina y los filamentos intermedios constituyen el citoesqueleto. Estos microtúbulos suelen participar en distintas funciones como en el tráfico vesicular, la división celular, el desplazamiento celular y la formación de los cilios y flagelos.¹⁰

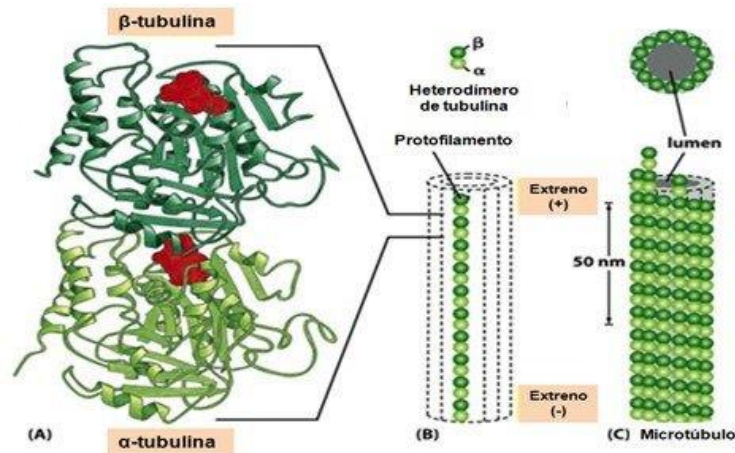


Figura 1. Estructura de la tubulina.

También desempeñan un papel importante en las funciones celulares mitóticas e interfásicas, lo que les confiere gran importancia como dianas farmacológicas contra el cáncer. Los agentes dirigidos a los microtúbulos (MTA) inhiben la proliferación de células cancerosas al interrumpir los eventos de señalización celular en interfase y/o impedir el funcionamiento preciso de los microtúbulos del huso, ambos inducen la muerte celular por apoptosis.¹¹

Los MTA se clasifican en dos categorías: agentes estabilizadores de microtúbulos y agentes desestabilizadores de microtúbulos. Los agentes estabilizadores de microtúbulos son una clase de fármacos que promueven la polimerización de la tubulina y estabilizan los microtúbulos contra la despolimerización. Por otro lado, los agentes desestabilizadores de microtúbulos despolimerizan los microtúbulos existentes y/o evitan que los heterodímeros de tubulina formen polímeros.¹¹

Los agentes estabilizadores de microtúbulos se clasifican en dos tipos según sus sitios de unión a la tubulina: agentes de unión al sitio de taxano (p. ej., paclitaxel, docetaxel, discodermolida, epotilonas y zampanólida) y agentes de unión al sitio de pelorusida/laulimalida (p. ej., pelorusida A y laulimalida).¹¹ Los agentes desestabilizadores de microtúbulos se clasifican en agentes de unión al sitio de la vinca (p. ej., vinblastina, vincristina y halicondrina B), agentes de unión al sitio de colchicina (p. ej., combretastatinas y 2-metoxiestradiol), agentes de unión al sitio de maitansina (p. ej., maitansina, rizoxina y PM60184), y agentes de unión al sitio de pironetina (p. ej., pironetina) (Figura 2).

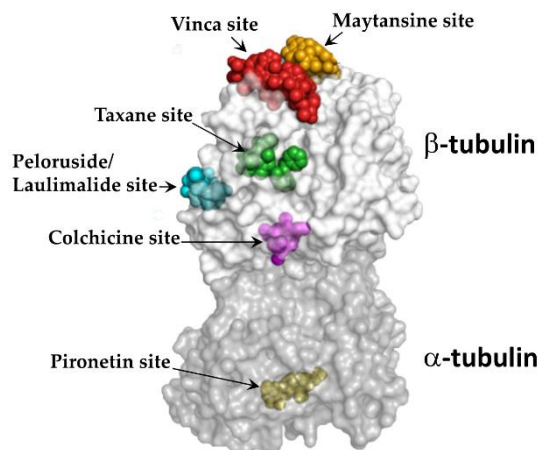


Figura 2. Sitios de unión de agentes dirigidos a microtúbulos en la tubulina.

Actualmente, se conoce una gran variedad de inhibidores de COX-2 y tubulina, sin embargo, pocas moléculas se han reportado con actividad inhibitoria sobre ambos blancos, ejemplo de ellos son los derivados de *2H*-indazol.¹²

2.5 Compuestos bioactivos con núcleo indazol

Los indazoles son compuestos heterocíclicos nitrogenados, cuya estructura contiene un anillo de pirazol y un benceno fusionado con dos formas tautoméricas principales: *1H*-indazol y *2H*-indazol. El tautómero *1H*-indazol es termodinámicamente más estable y es la forma predominante (Figura 3).

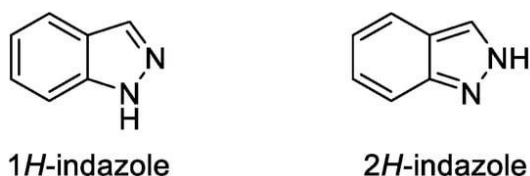


Figura 3. Núcleo de indazol y sus formas tautoméricas.

Los derivados del indazol apenas se encuentran en la naturaleza, sin embargo, este núcleo se encuentra en una variedad de compuestos sintéticos con una amplia gama de actividades farmacológicas como antiinflamatorios, antiarrítmicos, antitumorales, antifúngicos, antibacterianos y anti-VIH.¹² El núcleo de indazol puede funcionalizarse con alta selectividad en diferentes posiciones, permitiendo generar una gran cantidad de derivados con diversas propiedades terapéuticas.

Algunos fármacos que contienen la estructura del indazol son el granisetron, un fármaco utilizado para prevenir las náuseas y los vómitos causados por la quimioterapia y

radioterapia, y la bencidamina, un fármaco utilizado en el enjuague bucal para el tratamiento de llagas y lesiones leves en la boca (Figura 4).

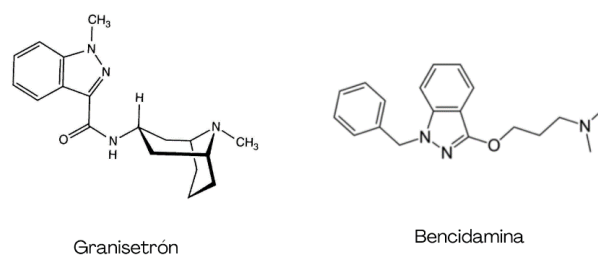


Figura 4. Fármacos con 1*H*-indazol en su estructura.

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado derivados híbridos de indazol y la combretastatina A-4 con un núcleo central 2,3-difenil-2*H*-indazol, entre los derivados se encontraron cuatro compuestos con potente actividad citotóxica que inducen muerte celular por apoptosis (**J134**, **J135**, **J142** y **J144**). Además, algunos de estos derivados han mostrado actividad sobre COX-2 (**J144**). En la Figura 5 se muestran las estructuras de **J142** y **J144** que mostraron actividad *in vitro* sobre COX-2 y tubulina.¹³

Por lo tanto, en la presente investigación se sintetizaron tres nuevos derivados de 2,3-difenil-1*H*-indazol (**MDP1–4**) y realizó el acoplamiento molecular sobre los dos blancos de interés, con la finalidad de explorar la relación estructura-actividad de dichas moléculas y con ello aportar al estudio de estos derivados (Figura 5).

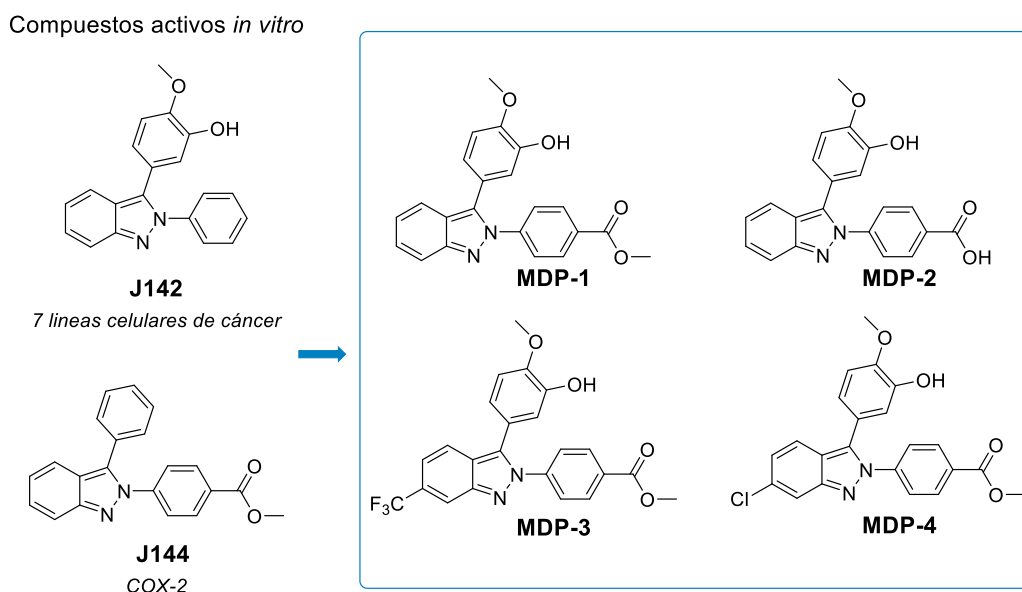


Figura 5. Diseño de cuatro nuevos derivados 2,3-difenil-2*H*-indazol **MDP1–MDP4**

3. Planteamiento del problema y justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el 2020 se atribuyeron a esta enfermedad cerca de 10 millones de defunciones.⁵ No obstante, su detección temprana y el tratamiento adecuado son esenciales para mejorar el pronóstico de los pacientes. La quimioterapia es uno de principales tratamientos contra el cáncer, sin embargo, los casos de resistencia a los fármacos convencionales y los efectos adversos crean una necesidad constante de nuevas moléculas bioactivas. Una estrategia propuesta es el desarrollo de nuevos fármacos con mecanismo de acción diferente a los tratamientos convencionales o con más de un mecanismo de acción, como en este caso donde se plantea la actividad dual sobre la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la tubulina. La COX-2 es una enzima que se relaciona con el crecimiento de las células tumorales, ya que algunos tumores la sobreexpresan, por lo cual al bloquear su actividad se puede reducir la proliferación celular como se ha observado con algunos antiinflamatorios. Por otro lado, la tubulina es una proteína que participa en la multiplicación y en el movimiento de las células; por ello su inhibición afecta su funcionamiento y lleva a la muerte celular.² Por lo anterior, ambas son blancos prometedores en el tratamiento contra el cáncer.

Actualmente se conoce una gran variedad de inhibidores de estas proteínas, sin embargo, pocas moléculas se han reportado con actividad inhibitoria sobre ambos blancos, ejemplo de ellos son los derivados de *2H*-indazol.¹² Por lo anterior, la presente investigación tuvo como finalidad la obtención de nuevas moléculas derivadas de *2H*-indazol que permitan ampliar el conocimiento sobre los requerimientos estructurales de los inhibidores duales de la COX-2 y tubulina. Además, se complementa con un estudio de acoplamiento molecular para poder analizar los potenciales modos de unión e interacciones proteína-ligando, con la finalidad de explorar dichas moléculas y poder aportar al estudio de estas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Sintetizar nuevas moléculas derivadas de *2H*-indazol como potenciales inhibidores duales de la ciclooxigenasa-2 y de la tubulina para la búsqueda de nuevos compuestos contra el cáncer.

4.2 Objetivos específicos

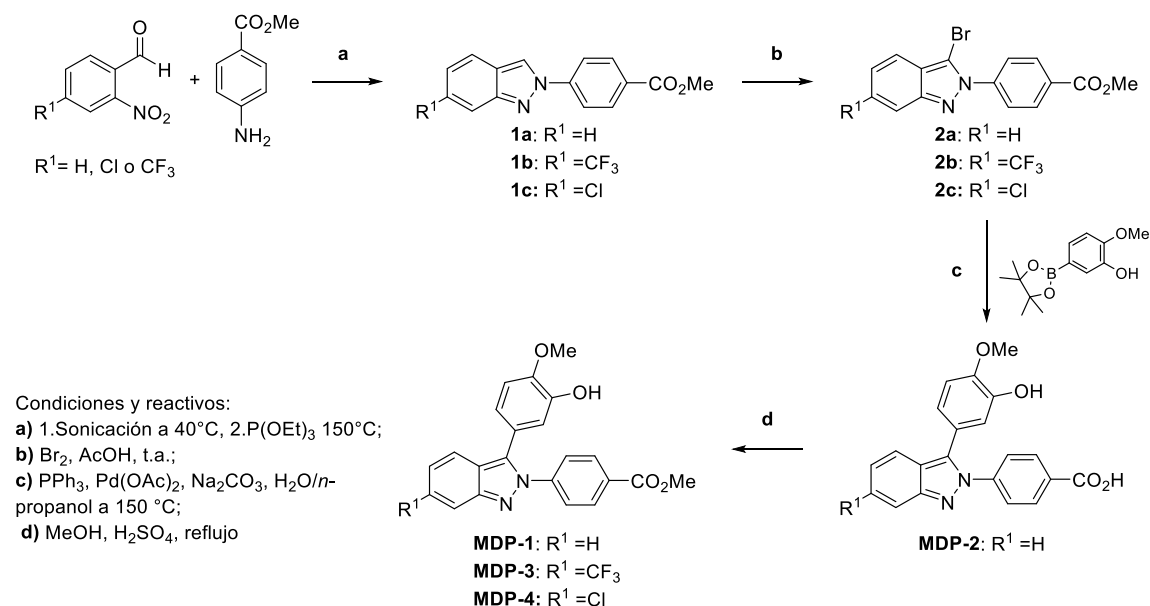
- Sintetizar cuatro nuevas moléculas derivadas de *2H*-indazol.
- Caracterizar los compuestos obtenidos por síntesis química empleando Resonancia Magnética Nuclear.
- Evaluar la afinidad de los compuestos obtenidos sobre la ciclooxigenasa-2 y la tubulina por acoplamiento molecular.

5. Metodología

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Síntesis y Aislamiento de Sustancias Bioactivas (N-015) del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM Xochimilco. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados por su punto de fusión, factor de retención (Rf) y RMN de ¹H.

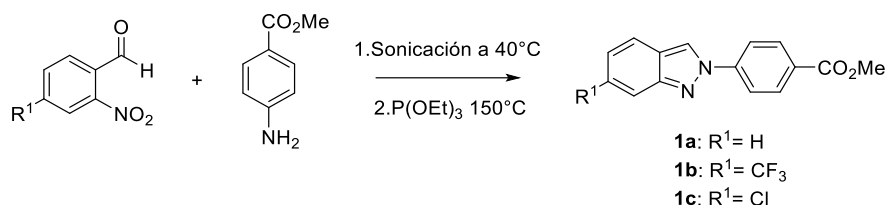
5.1 Ruta general de síntesis para los compuestos **MDP-1** a **MDP-4**

La síntesis de los compuestos propuestos se llevó a cabo mediante una ruta de cuatro etapas, que incluyen la ciclación para formación del núcleo 2-fenil-*2H*-indazol, la bromación selectiva de la posición 3 del indazol, el acoplamiento C-C de Suzuki-Miyaura y una esterificación de Fisher ¹² (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis general de los compuestos **MDP-1–MDP-4**.

5.1.1. Síntesis de intermediarios 2-fenil-2*H*-indazol (**1a**, **1b**, **1c**)



Esquema 2. Ciclación del 2*H*-indazol.

En un matraz redondo se colocaron 1.65 mmol de 4-aminobenzoato de metilo y 1.65 mmol del 2-nitrobenzoaldehído adecuadamente sustituido. Posteriormente, los sólidos fueron mezclados y llevados al sonicador por 2 horas a 40 °C. Terminado el tiempo de reacción, ésta se llevó a la campana de vacío por 12 horas para eliminar la humedad. En el siguiente paso de reacción, la imina formada se hizo reaccionar con 3 eq. de P(OEt)₃ y se calentó a reflujo por 2-3 horas, hasta que se agotó la materia prima. La reacción fue monitoreada por CCF (Esquema 2). Terminado el tiempo de reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 10 mL de metanol y se dejó en refrigeración hasta la formación de un precipitado que se separó por filtración al vacío.

5.1.1.1. 4-(2*H*-indazol-2-il)benzoato de metilo (**1a**)

Para la obtención de este compuesto se aplicó una modificación de la metodología descrita en el punto 5.1.1, para ello fue necesario repetir tres veces el proceso de sonicación (tres horas) y exposición al vacío (12 horas). Se obtuvo un sólido beige con rendimiento del 47.15%, con un factor de retención de 0.55 en una fase (Hex: AcOEt 70:30).

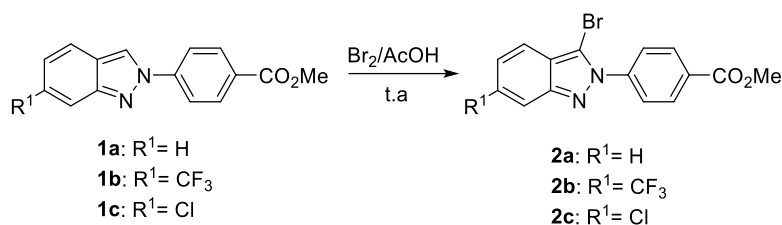
5.1.1.2. 4-(6-(Trifluorometil)-2*H*-indazol-2-il)benzoato de metilo (**1b**)

Siguiendo la metodología descrita en el punto 5.1.1. se obtuvo un sólido aperlado con rendimiento del 76.71%, con un factor de retención de 0.60 en una fase (Hex: AcOEt 70:30).

5.1.1.3. 4-(6-Cloro-2*H*-indazol-2-il)benzoato de metilo (**1c**)

Siguiendo la metodología descrita en el punto 5.1.1. se obtuvo un sólido beige con rendimiento del 71.50%, con un factor de retención de 0.72 en una fase (Hex: AcOEt 60:40).

5.1.2. Síntesis de intermediarios 3-bromo-2-fenil-2*H*-indazol (**2a**, **2b**, **2c**)



Esquema 3. Bromación del 2*H*-indazol.

En un matraz bola de 50 mL se colocó 1 mmol de 2-fenil-2*H*-indazol (**1a**, **1b** o **1c**) disuelto en 20 mL de AcOH, después se añadieron lentamente 1 mL de una solución 1M de Br₂ en AcOH, manteniendo la mezcla con agitación vigorosa a temperatura ambiente toda la noche. Terminada la reacción, en un vaso de precipitados se colocó agua-hielo y se vertió la mezcla de reacción, manteniendo agitación constante para formar un precipitado, el cual se recuperó por filtración al vacío y se dejó secar (Esquema 3).

5.1.2.1. 4-(3-Bromo-2*H*-indazol-2-il)benzoato de metilo (**2a**)

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se obtuvo un sólido beige claro con rendimiento del 91.46%, con un factor de retención de 0.68 en una fase (Hex: AcOEt 70:30).

5.1.2.2. 4-(3-Bromo-6-(trifluorometil)-2*H*-indazol-2-il)benzoato de metilo (**2b**)

Siguiendo la metodología descrita en el punto 5.1.2, se obtuvo un sólido beige con rendimiento del 65%, con un factor de retención de 0.71 en una fase (Hex: AcOEt 70:30).

5.1.2.3. 4-(3-Bromo-6-cloro-2*H*-indazol-2-il)benzoato de metilo (**2c**)

Siguiendo la metodología descrita en el punto 5.1.2, se obtuvo un sólido apalardo con rendimiento del 43%, con un factor de retención de 0.77 en una fase (Hex: AcOEt 70:30).

5.1.3. Síntesis de los compuestos finales **MDP-1**, **MDP-3** y **MDP-4**

En un vial de microondas de 10 mL se colocó 3-bromo-2-fenil-2*H*-indazol (1 eq.) (**2a**, **2b** o **2c**), estér borónico (1.1 eq.), acetato de paladio (0.01 eq.), carbonato de sodio (1.2 eq.) y trifenilfosfina (0.03 eq.). En seguida se adicionaron 4 mL de *n*-propanol y 1 mL de agua como medio de reacción y se calentó en un reactor de microondas a 150°C por 20 minutos. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el residuo se resuspendió en una solución acuosa de HCl (pH=1) y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se recuperó y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto resultante se disolvió en 5 mL de MeOH con 1 gota de H₂SO₄ y se llevó nuevamente al microondas a 120°C por

5 minutos. Al término, se adicionaron 30 mL de una solución al 10% bicarbonato de sodio y se realizó una extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se recuperó y concentró en el rotaevaporador y finalmente el producto se purificó por medio de cromatografía en columna usando como fase móvil Hex:AcOEt (9:1).

5.1.3.1. 4-(3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2H-indazol-2-il) benzoato de metilo (**MDP-1**)

Siguiendo la metodología descrita se obtuvo un sólido blanco con rendimiento del 17 %, con un factor de retención de 0.84 una fase (Hex: AcOEt 60:40) y un punto de fusión de 188°C.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ=8.05 (d, *J*=8.34 Hz, 2H), 7.77 (dd, *J*=8.82, 0.66 Hz, 1H), 7.71-7.65 (m, 1H), 7.54 (d, *J*=8.52 Hz, 2H), 7.39-7.33 (m, 1H), 7.15-7.09 (m, 1H), 6.95 (d, *J*=2.04 Hz, 1H), 6.86 (d, *J*=8.34 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J*= 8.22, 2.04 Hz, 1H), 5.82 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.93 (s, 3H).

5.1.3.2. 4-(3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-6-(trifluorometil)-2H-indazol-2-il) benzoato de metilo (**MDP-3**)

Siguiendo la metodología descrita se obtuvo un sólido beige con rendimiento del 8%, con un factor de retención de 0.47 en una fase (Hex: AcOEt 60:40) y un punto de fusión de 99°C.

¹H RMN (600 MHz, DMSO): δ=9.33 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.06 (d, *J*=8.64 Hz, 2H), 7.87 (d, *J*= 8.82 Hz, 1H), 7.62 (d, *J*= 8.58 Hz, 2H), 7.39-7.33 (m, 1H), 7.01 (d, *J*= 8.16 Hz, 1H), 6.83-6.76 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.81 (s, 3H).

5.1.3.3. 4-(6-Cloro-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2H-indazol-2-il) benzoato de metilo (**MDP-4**)

Siguiendo la metodología descrita se obtuvo un sólido blanco con rendimiento del 35 %, con un factor de retención de 0.47 (Hex:AcOEt 60:40) y con un punto de fusión de 195°C.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ=8.06 (d, *J*= 8.58 Hz, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.61 (d, *J*= 8.94 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*= 8.46 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J*= 8.94, 1.62 Hz, 1H), 6.92 (d, *J*= 1.98 Hz, 1H), 6.87 (d, *J*= 8.28 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J*= 8.28, 1.98 Hz, 1H), 5.69 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.93 (s, 3H) ppm.

5.2 Evaluación por acoplamiento molecular sobre ciclooxigenasa-2 y tubulina

5.2.1 Preparación de los ligandos

Los ligandos fueron construidos en ChemDraw y salvados en formato *.sdf. La estructura de los compuestos se optimizó empleando el campo de fuerza MMFF94 en el programa Data Warrior. La estructura de ciclooxigenasa-2 se obtuvo de The *Protein Data Bank*, con código 5KIR, la cual fue preparada en el programa de Yasara mediante los siguientes pasos: 1) Remoción de las moléculas de agua y otros residuos ajenos a la enzima, 2) Asignación de los estados de protonación para los residuos de aminoácidos a pH fisiológico, 3) Minimización de la enzima empleando el campo de fuerza NOVA. Por otro lado, la estructura de tubulina se obtuvo de The *Protein Data Bank*, con código 5LYK y fue preparada en el programa Yasara siguiendo los pasos 1 a 3 descritos previamente.

5.2.2 Validación y acoplamiento molecular

Para COX-2 se definió un *grid* de búsqueda centrado en el ligando cocrystalizado rofecoxib (sitio alostérico). Se empleó el *grid* de forma cúbica con tamaño de 20.46 Å. El proceso se validó construyendo el ligando cocrystalizado bajo el mismo protocolo que los compuestos de prueba, para posteriormente acoplar sobre el sitio alostérico, empleando el campo de fuerza AMBER03 y 100 corridas en AutoDock Vina y AutoDock 4.2 desde la interfaz de Yasara. Se determinó el valor de RMSD entre el ligando acoplado y el cocrystalizado, el cual fue menor a 2Å. Los ligantes **MDP-1** a **MDP-4** se evaluaron siguiendo el protocolo anterior con los dos programas. Se analizaron las energías de unión ($\Delta G = \text{kcal/mol}$), poses e interacciones ligando-receptor en modelo 2D, usando *Discovery Studio*.

Por otro lado, para tubulina se definió un *grid* de búsqueda centrado en el ligando cocrystalizado combretastatina A4 (sitio de la colchicina). Se empleó el *grid* de forma cúbica con tamaño de 22.70 Å. El proceso de igual forma se validó construyendo el ligando cocrystalizado bajo el mismo protocolo que los compuestos de prueba, para posteriormente acoplar sobre el sitio alostérico, empleando el campo de fuerza AMBER03 y 100 corridas en AutoDock Vina y AutoDock 4.2 desde la interfaz de Yasara. Posteriormente, se determinó el valor de RMSD entre el ligando acoplado y el cocrystalizado, el cual fue menor a 2Å. Los ligantes **MDP-1** a **MDP-4** se evaluaron siguiendo el protocolo anterior con los dos programas. Se analizaron las energías de unión ($\Delta G = \text{kcal/mol}$), poses e interacciones ligando-receptor en modelo 2D, usando *Discovery Studio*.

6. Resultados y discusión

6.1 Síntesis orgánica

Se obtuvieron tres de los derivados propuestos del 2*H*-indazol en cantidad suficiente para su caracterización por su punto de fusión, factor de retención y espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H). Las principales características fisicoquímicas de cada compuesto se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de **MDP-1**, **MDP-3** y **MDP-4**

Compuesto	Punto de fusión	Sistema de CCF	Factor de retención (Rf)	Apariencia	Rendimiento
MDP-1	188°C	Hex: AcOEt 60:40	0.84	Sólido blanco	17%
MDP-3	99°C	Hex: AcOEt 60:40	0.47	Sólido beige	8%
MDP-4	195°C	Hex:AcOEt 60:40	0.47	Sólido blanco	35%

Los intermediarios **1a–c** se obtuvieron con rendimientos entre 47.15–76.15%, teniendo el menor rendimiento el compuesto **1a**, sin sustitución en la posición 6 del indazol (47.15%), esto pese a recibir más ciclos de sonicación. En la siguiente etapa de reacción se realizó la bromación de los indazoles **1a–c**, para obtener los derivados **2a**, **2b** y **2c**, respectivamente. El intermediario **2a** presentó el mejor rendimiento (91.46 %) en comparación con **2b** y **2c**, esto se debe a que el anillo del indazol no se encuentra sustituido en la posición 6, es decir, la presencia de un grupo desactivador (-CF₃ y -Cl) influye en la reactividad del anillo durante la bromación. Finalmente, obtener los compuestos **MDP-1**, **MDP-3** y **MDP-4** se realizó un acoplamiento de Suzuki-Miyaura de los indazoles bromados (**2a**, **2b** o **2c**) y el éster pinacol del ácido 3-hidroxi-4-metoxifenilborónico, con rendimientos de 17%, 8% y 35% respectivamente. Este bajo rendimiento puede deberse a que durante la reacción se observan subproductos, siendo el respectivo indazol (**1a**, **1b** y **1c**) el producto mayoritario, es decir, bajo las condiciones de reacción se favorece la deshalogenación en C3.

6.2 Elucidación estructural de los compuestos finales

La asignación de las señales de RMN ¹H para cada compuesto se muestran en las **Figuras 7–9** y los espectros completos pueden consultarse en la sección de anexos (**Espectro 1–3**).

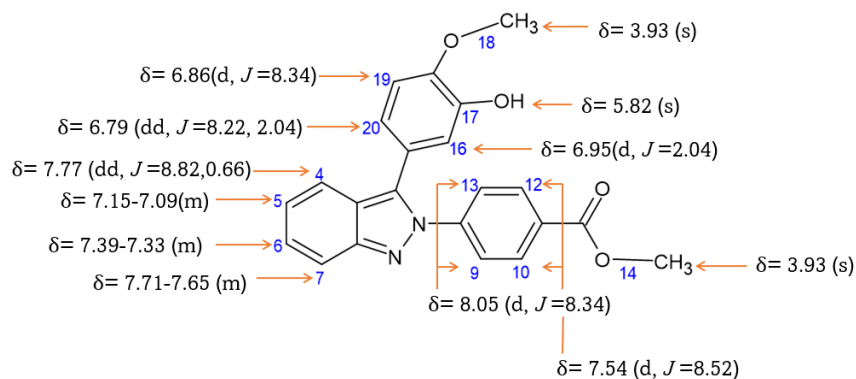


Figura 7. Asignación de señales de RMN ^1H para el compuesto **MDP-1**.

Para el compuesto **MDP-1**, se observa un singulente con desplazamiento de 3.93 ppm cuya integración corresponde a seis hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos de los grupos metoxilo y carbometoxilo, que al ser bastante similares se observan cómo equivalentes (Figura 7). La señal con desplazamiento de 5.82 ppm corresponde al grupo hidroxilo, ya que se trata de una señal ancha, cuya integración es para un hidrógeno. Por otro lado, para el anillo de indazol se observan cuatro señales características: las señales en 7.09-7.15 y 7.33-7.39 ppm para los hidrógenos 5 y 6. Para el anillo trisustituido se observan tres señales en 6.79, 6.86 y 6.95 ppm, cuya asignación se realizó de acuerdo con los valores de las constantes de acoplamiento (J). Por último, para el anillo disustituido las señales en 7.54 y 8.05 ppm, se observan como dobletes y corresponden a dos hidrógenos cada una.

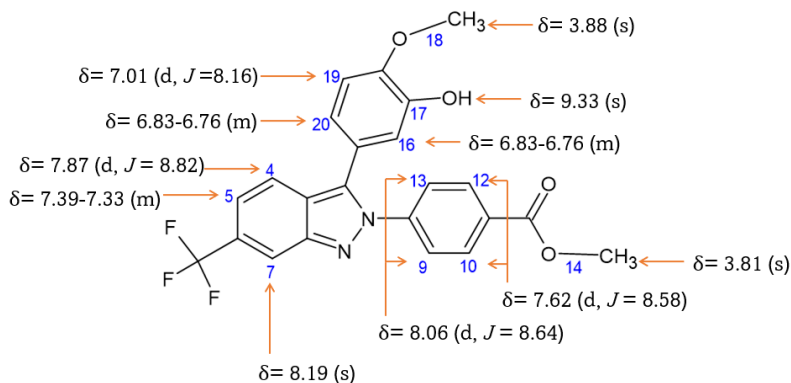


Figura 8. Asignación de señales de RMN ^1H para el compuesto **MDP-3**.

Para el compuesto **MDP-3**, las señales con desplazamiento de 3.81 y 3.88 ppm corresponden a los hidrógenos de los grupos metoxilo y carboximetoxilo señalados como 14 y 18 (Figura 8), cuya integración de cada una corresponde para tres hidrógenos. La señal con desplazamiento de 9.33 ppm corresponde al grupo hidroxilo, ya que se trata de una señal ancha, cuya integración es para un hidrógeno. Para el anillo de indazol se observan tres señales que integran para un hidrógeno en 7.33-7.39, 7.87 y 8.19 ppm, consistentes con el anillo sustituido en C6. Para el anillo en posición 3 se observan dos señales en 7.01 ppm que integra para un hidrogeno y en 6.76-6.83 ppm que integra para dos hidrógenos. Por último, las señales con desplazamiento de 7.62 y 8.06 ppm integran para dos hidrógenos y pueden asignarse al anillo en posición 2.

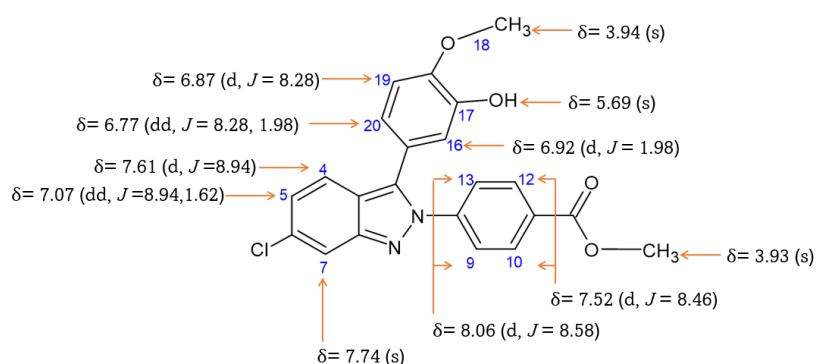


Figura 9. Asignación de señales de RMN ^1H para el compuesto **MDP-4**.

Para el compuesto **MDP-4**, las señales con desplazamiento de 3.94 y 3.93 ppm corresponden a los hidrógenos de los grupos metoxilo y carboximetoxilo señalados como 14 y 18 (Figura 9), cuya integración de cada una corresponde para tres hidrógenos. La señal ancha con desplazamiento de 5.69 ppm, cuya integración es para un hidrógeno, corresponde al grupo hidroxilo. Por otro lado, las señales con desplazamiento 6.77, 6.87 y 6.92 ppm corresponden al anillo trisustituido en posición 3, y las señales con desplazamiento de 7.52 y 8.06 ppm corresponden a los hidrógenos del anillo disustituido en posición 2. Por último, para el anillo de indazol se observan tres señales en 7.07, 7.61 y 7.74 ppm que integran para un hidrógeno cada una.

6.3 Acoplamiento molecular

6.3.1. Acoplamiento molecular sobre tubulina

El acoplamiento realizado fue de tipo flexible-rígido, siendo estandarizado con 100 ciclos tanto para AutoDock Vina y AutoDock 4.2, así mismo, el análisis fue realizado sobre el sitio

de la colchicina, teniendo como ligando cocrystalizado a combretastatina (**CA-4**). En la Tabla 2, se muestran los valores obtenidos durante dicho acoplamiento. Además, se puede observar en la Figura 10 que CA-4 acoplado (rojo) reproduce la pose de unión de CA-4 cocrystalizada (verde) en la proteína, por lo cual se puede considerar el método desempeña satisfactoriamente.

Tabla 2. Resultados obtenidos del *docking* para los compuestos **MDP-1** a **MDP-4**

Compuesto	AutoDock vina ($\Delta G =$ kcal/mol)	AutoDock 4.2 ($\Delta G =$ kcal/mol)
MDP-1	-6.76	-10.88
MDP-2	-7.95	-10.24
MDP-3	-7.67	-10.40
MDP-4	-6.78	-10.64
CA-4	-8.08	-8.63

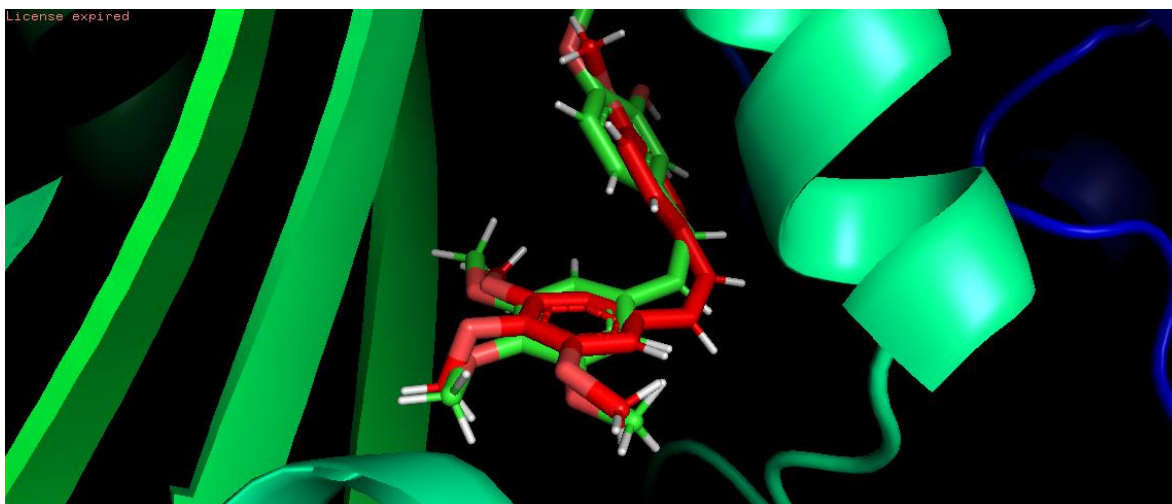


Figura 10. Pose de unión en el sitio activo de tubulina con su ligando cocrystalizado **CA-4** (verde) y reacoplado con AutoDock Vina (rojo).

Los compuestos propuestos mostraron afinidad por el sitio activo, presentando mejores energías de unión que la referencia **CA-4** (Tabla 2) con Autodock 4.2. No obstante, el compuesto **MDP-1** obtuvo la mejor puntuación en el programa AutoDock 4.2 y podría ser un buen prospecto para crear nuevos derivados debido a la pose de unión similar a **CA-4** (Figura 11). De acuerdo con los resultados obtenidos en el programa AutoDock 4.2, los compuestos **MDP-1**, **MDP-2**, **MDP-3** y **MDP-4** tienen potencial para presentar actividad citotóxica.

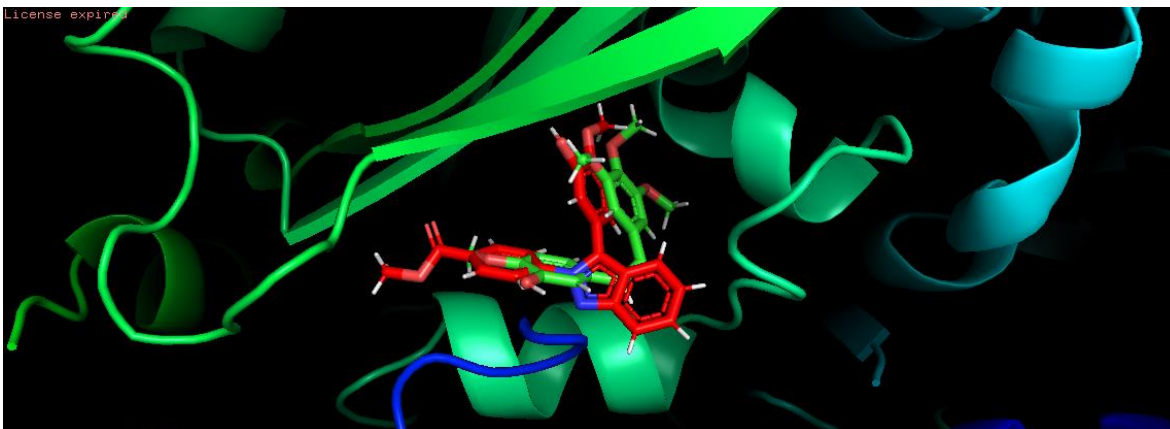


Figura 11. Pose de unión en el sitio activo de tubulina con su ligando cocristalizado **CA-4** reacomplado con AutoDock vina (verde) y **MDP-1** acoplado con AutoDock vina (rojo).

6.3.2. Acoplamiento molecular sobre ciclooxygenasa-2

El acoplamiento realizado fue de tipo flexible-rígido, siendo estandarizado con 100 ciclos tanto para AutoDock Vina y AutoDock 4.2, así mismo, el análisis fue realizado en el sitio activo de ciclooxygenasa-2, teniendo como ligando cocristalizado a rofecoxib (**RCX**). En la Tabla 3, se muestran los valores obtenidos durante dicho acoplamiento. Además, se puede observar en la Figura 12 que la pose obtenida durante la validación reproduce la pose de unión del ligando cristalizado, por lo cual se puede considerar el método desempeña satisfactoriamente.

Tabla 3. Resultados obtenidos del docking para los compuestos **MDP-1** a **MDP-4**

Compuesto	AutoDock vina ($\Delta G = \text{kcal/mol}$)	AutoDock 4.2 ($\Delta G = \text{kcal/mol}$)
MDP-1	-9.78	-11.01
MDP-2	-10.55	-11.17
MDP-3	-9.90	-11.30
MDP-4	-10.13	-11.82
RCX	-9.81	-9.98

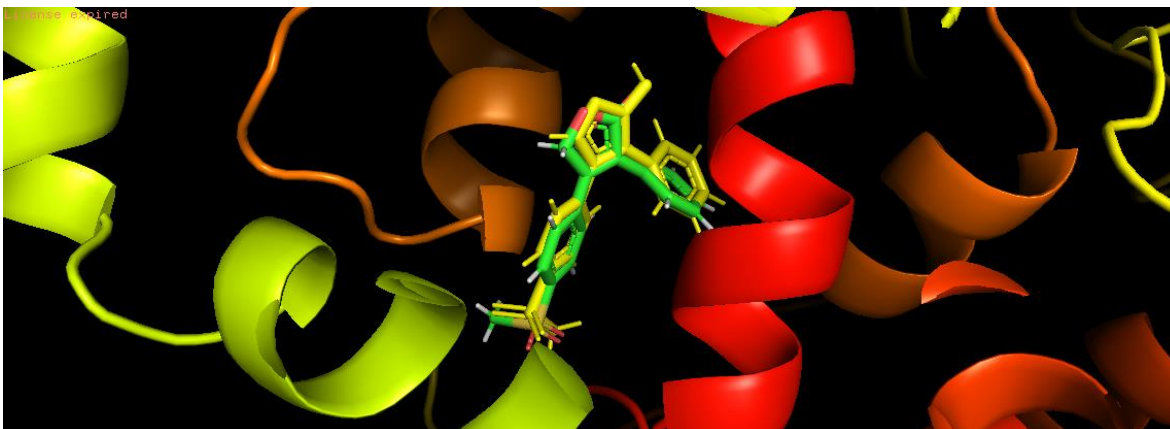


Figura 12. Pose de unión en el sitio activo de COX-2 con su ligando cocristalizado **RCX** (amarillo) y reacoplado con AutoDock Vina (verde).

Los compuestos propuestos mostraron tener mayor afinidad por el sitio activo, presentando mejores energías de unión que la referencia **rofecoxib** (Tabla 2). No obstante, el compuesto **MDP-4** obtuvo la mejor puntuación en ambos programas. Sin embargo, el compuesto **MDP-3** posee una pose de unión similar a **rofecoxib** en ambos programas y de igual manera posee una energía de unión superior a la de la referencia, por lo tanto, podría ser un buen prospecto para evaluaciones *in vitro* (Figura 13). De acuerdo con los resultados obtenidos en ambos programas los compuestos propuestos tienen mayor potencial para presentar actividad sobre COX-2.

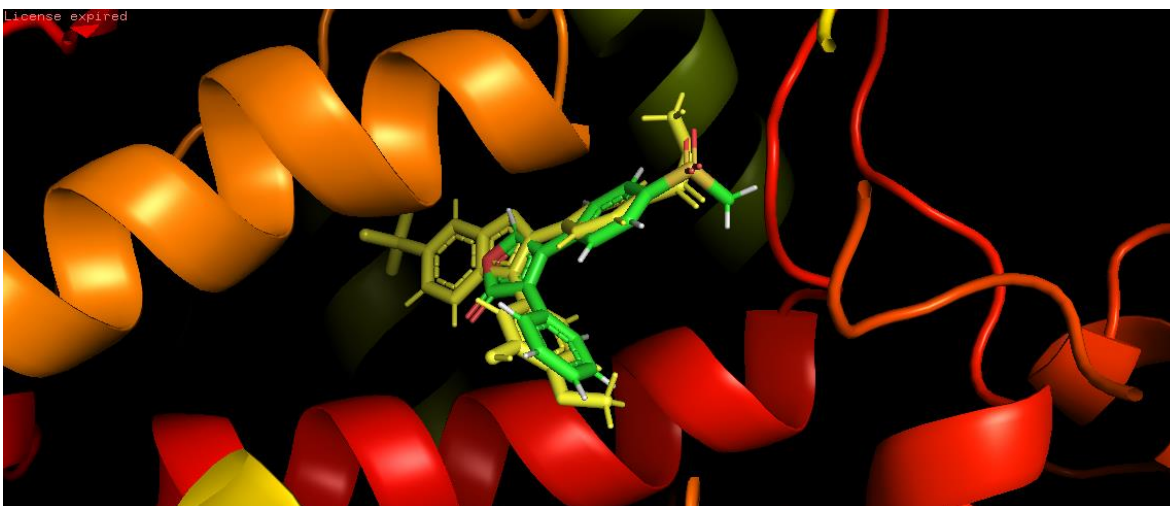


Figura 13. Pose de unión en el sitio activo de COX-2 con su ligando cocristalizado **RCX** reacoplado con AutoDock vina (verde) y **MDP-3** acoplado con AutoDock vina (amarillo).

7. Conclusiones

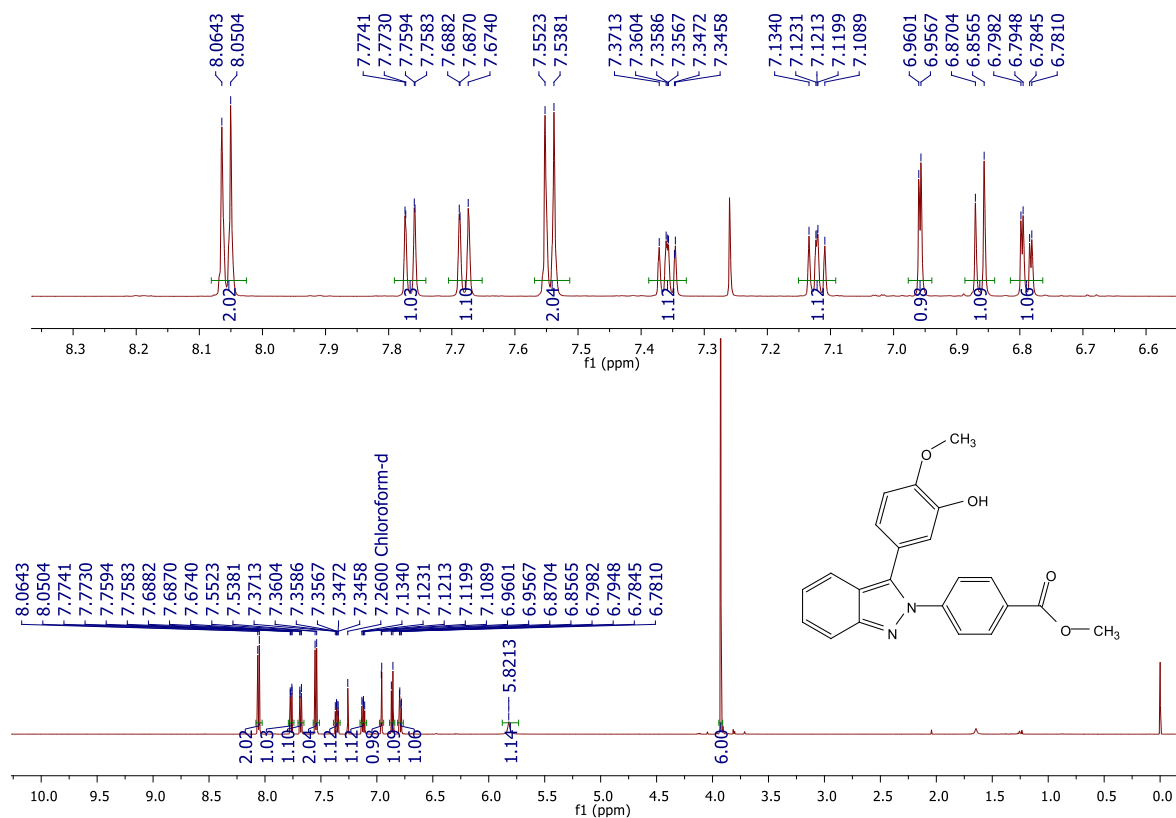
Se realizó la síntesis de tres derivados de *2H*-indazol, siendo caracterizados por punto de fusión, factor de retención y RMN de ¹H. Las rutas de síntesis empleadas permitieron obtener los compuestos en cantidad suficiente.

Con los resultados obtenidos del acoplamiento molecular, se puede concluir que los compuestos propuestos **MDP-1** a **MDP-4** tienen buena afinidad sobre ciclooxigenasa-2 y tubulina, puesto que las energías de unión superan a la del ligando cocrystalizado, este resultado es favorable para continuar con el estudio de dichas moléculas.

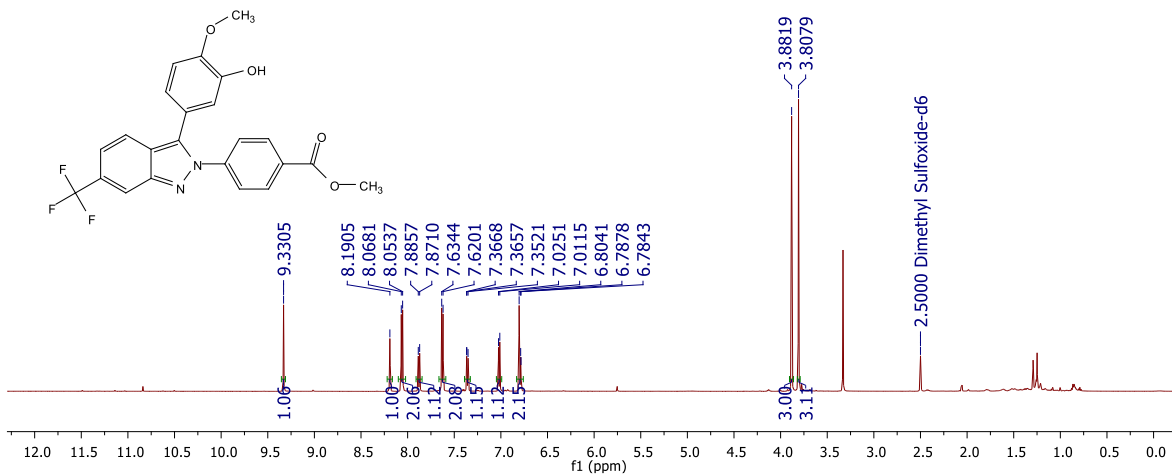
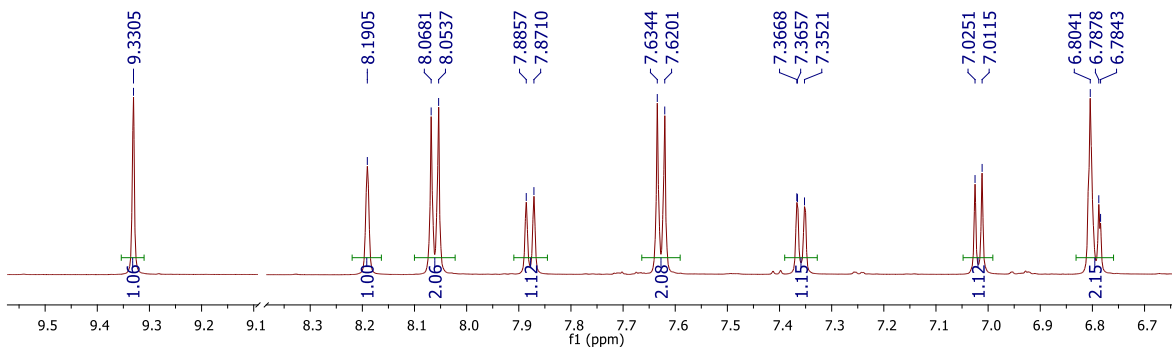
8. Referencias

1. Zelman, M., Raymon, J., Holdaway, P., & Dafnis, E. (2018). Fisiopatología. 8ª ed., Vol.1. Pearson Educación
2. Diccionario de Cáncer del NCI. (s. f.). Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionarioscancer/def/tubulina>
3. Cáncer: MedlinePlus enciclopedia médica. (s. f.). <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001289.htm#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20se%20origina%20de,gen%C3%A9tico%20de%20una%20c%C3%A9lula%20cambia.>
4. Organización Mundial de la Salud. (2022). Nota descriptiva: Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
5. Roy, P., & Saikia, B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *PubMed*, 53(3), 441.
6. Lake, R.A., and Robinson, B.W. (2005). Immunotherapy and chemotherapy a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 5, 397-405.
7. American Cancer Society (s. f.). Efectos secundarios de la quimioterapia. <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/efectos-secundarios-de-la-quimioterapia.html>
8. Fesik, S.W. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5, 876-885.
9. Morris, P.G., and Fornier, M.N. (2008). Microtubule active agents: beyond taxane frontier. *Clin Cancer Res* 14, 7167-7172.
10. Li, W.; Sun, H.; Xu, S.; Zhu, Z.; Xu, J. Tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site: A perspective of privileged structures. *Future Med. Chem.* 2017, 9, 1765–1794.
11. Zhang, S., Liang, C., & Zhang, W. (2018). Recent advances in indazole-containing derivatives: Synthesis and biological perspectives. *Molecules*, 23(11), 2783.
12. Pérez-Villanueva, J., Matadamas-Martínez, F., Yépez-Mulia, L., Pérez-Koldenkova, V., Leyte-Lugo, M., Rodríguez-Villar, K., Cortés-Benítez, F., Macías-Jiménez, A. P., González-Sánchez, I., Romero-Velásquez, A., Palacios-Espinosa, J. F., & Soria Arteche, O. (2021). Synthesis and cytotoxic activity of combretastatin A-4 and 2,3 Diphenyl-2H-indazole hybrids. *Pharmaceuticals*, 14(8), 815.
13. PharmaMar. (2024). *Quimioterapia dirigida a tubulina: una historia del poder de la naturaleza* - PharmaMar. <https://fundacionpharmamar.com/event/quimioterapia-dirigida-a-tubulina-una-historia-del-poder-de-la-naturaleza/#:~:text=La%20tubulina%20componente%20esencial%20de,terapias%20oncol%C3%B3gicas%20de%20amplio%20espectro.>

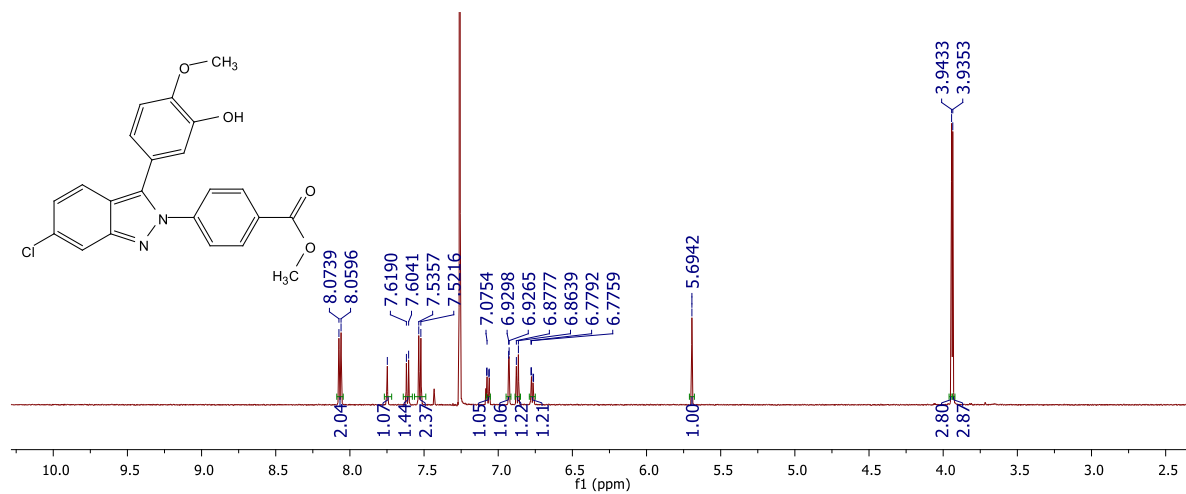
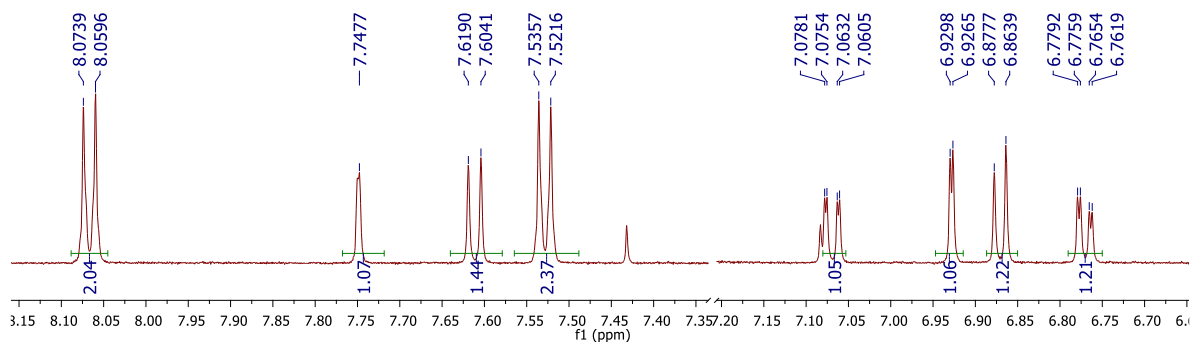
9. Anexos



Espectro 1. RMN ¹H de 4-(3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-2H-indazol-2-il) benzoato de metilo (MDP-1)



Espectro 2. RMN ^1H de 4-(3-(3-Hidroxi-4-metoxifenil)-6-(trifluorometil)-2*H*-indazol-2-il) benzoato de metilo (**MDP-3**)



Espectro 3. RMN ^1H de 4-(6-Cloro-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2*H*-indazol-2-il) benzoato de metilo (**MDP-4**)