



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

DISEÑO, OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE FÁRMACOS Y BIOMOLÉCULAS

**ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y SÍNTESIS DE DIFENILINDOLES Y
DIFENILINDAZOLES DISEÑADOS A PARTIR DE COMBRETASTATINA A-4 COMO
POTENCIALES INHIBIDORES DE TUBULINA**

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

PRESENTA

Q.F.B. LIZETH YAZMIN PERCASTRE CRUZ

2213803119

COMITÉ TUTORIAL

Tutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva

Asesor: Dr. Juan Francisco Cortés Benítez

Asesor: Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez

AGOSTO, 2024

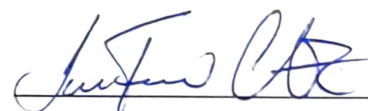
**Acoplamiento molecular y síntesis de difenilindoles y difenilindazoles
diseñados a partir de combretastatina A-4 como potenciales inhibidores de
tubulina**

Vo. Bo. Comité Tutorial

Tutor: Dr. Jaime Pérez Villanueva



Asesor: Dr. Juan Francisco Cortés Benítez



Asesor: Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez



Datos de la alumna:

Q.F.B. Lizeth Yazmin Percastre Cruz



2213803119



**Acoplamiento molecular y síntesis de difenilindoles y difenilindazoles
diseñados a partir de combretastatina A-4 como potenciales inhibidores de
tubulina**

Jurado del examen de Grado



Dr. Martín González Andrade

Presidente



Dr. Jaime Pérez Villanueva

Secretario



Dr. Marco Antonio Loza Mejía

Vocal



RESUMEN

El cáncer es considerado como la primera causa de muerte a nivel mundial, con un estimado de 10 millones de muertes en 2020. La quimioterapia sigue siendo una de las alternativas terapéuticas más importantes, por lo que el desarrollo de nuevas terapias dirigidas puede dar paso a combatir la resistencia adquirida durante el tratamiento; siendo los microtúbulos (constituidos por tubulina α y β) uno de los objetivos más prometedores de los fármacos contra el cáncer.

En el presente trabajo se plantea el diseño de nuevos derivados híbridos de indoles (**YPC-1A** y **YPC-2A**) e indazoles (**YPC-1–YPC-5**) con combretastatina A-4 (**CA-4**) que es un producto natural obtenido del sauce sudafricano *Combretum caffrum*, que ha demostrado tener una citotoxicidad elevada contra una variedad de células cancerosas, debido a que se une al sitio de unión de la colchicina en la interfaz de la α/β -tubulina. Tomando en cuenta el trabajo realizado en el grupo de trabajo del laboratorio de “síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas”, donde se realizaron híbridos de indazoles con **CA-4** obteniendo un compuesto con actividad citotóxica de importancia, sobre líneas celulares Hela y SK-LU-1 con valores de 0.16 y 6.63 μM , respectivamente.

Por lo tanto, se realizó acoplamiento molecular utilizando la interfaz de la α/β -tubulina como sitio de unión para las moléculas propuestas, posteriormente se realizó la síntesis de los compuestos, y se determinó la citotoxicidad en líneas celulares cancerosas SK-LU-1 y HeLa a través del ensayo de sulforodamina B. Se determinaron los porcentajes de inhibición de los compuestos a una concentración de 50 μM , con valores de 74.38 (SK-LU-1) y 62.57 (HeLa) para el mejor compuesto **YPC-2A**.

Además, se calculó la CI_{50} para los compuestos **YPC-2A**, **YPC-2** y **YPC-3**, obteniéndose valores de 7.38 μM (SK-LU-1) y 20.39 μM (HeLa) para el compuesto **YPC-2A**, que presentó la mejor CI_{50} para ambas líneas celulares.

Palabras clave: tubulina, cáncer, combretastatina A-4, microtúbulos.



AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por el apoyo otorgado para la realización del presente proyecto. CVU 1166439

Expreso un especial agradecimiento:

A mi tutor el Dr. Jaime Pérez Villanueva y a mis asesores el Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez y el Dr. Francisco Cortés Benítez, por su apoyo, orientación, ayuda y paciencia, así como sus valiosos comentarios y sugerencias durante la realización de este proyecto. Que sin ellos no hubiera sido posible. Les agradezco enormemente por todo.

Al Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa y a la Dra. Karen Rodríguez Villar, por su orientación y apoyo brindados durante la realización de este proyecto.

Por hacer posibles todos los espectros de resonancia magnética nuclear en tiempo y forma al Dr. Ernesto Sánchez.

A mis padres Yolanda y Jorge, a mis hermanos Jorge Antonio y Daniel Aarón, por siempre brindarme su apoyo incondicional, por estar en los momentos más difíciles de mi vida, porque día a día han estado dándome ánimos y fuerzas para continuar y no rendirme, por creer en mí, por sus consejos y por estar a mi lado en este y muchos otros proyectos en mi vida. Son lo más valioso y preciado que tengo.

A José Luis por sus valiosas enseñanzas y consejos, por los ánimos y palabras de aliento que me brinda a cada paso que doy, por su paciencia, por estar en momentos difíciles en mi vida, por caminar a mi lado y ser esa luz en mi vida, con mucho cariño.

Por su amistad, por sus palabras de aliento, por los ánimos, por estar en los momentos más difíciles de mi vida, por su ayuda y apoyo incondicional, con mucho cariño para mi amiga Diana. Porque sin ella, que ha estado en todo este proceso, no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A mis amigos y compañeros del laboratorio y de la maestría, por tantos buenos momentos, risas, alegrías y, sobre todo, por los aprendizajes: Maru Mendoza, Lady De la Cruz, Diana Islas, Cecilia Zarate, Antonio Medrano, Gabriel Manrique, Edwin Valladares, Sara Flores, Nohelia Pérez, Lucero Ruíz, Carlos Limón, Mitzi López, Grecia Torres, Dalia Castañeda, Fernanda Galaviz. También, por hacer más amenos y alegres mis días en el laboratorio a Paulina, Majo, Iván, David y Hannya.

A mis tías Rosa María, Candelaria, María de la Luz, Ruth, a mi tío Anselmo, a Alma Rosa, a Fernanda, porque son una parte esencial en mi vida, por estar apoyándome en esta etapa de mi vida y por siempre estar a mi lado en todo momento.

De todo corazón doy gracias a todas las personas que hicieron posible esto.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XIII
ÍNDICE DE COMPUESTOS SINTETIZADOS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Cáncer: principal problema en la actualidad.....	2
2.2 Quimioterapia y la resistencia a fármacos.....	3
2.3 Microtúbulos: dianas terapéuticas contra el cáncer.....	5
2.4 Agentes estabilizadores y desestabilizadores de tubulina.....	8
2.4.1 Agentes estabilizantes.....	8
2.4.1.1 Sitio de unión de Taxanos.....	9
2.4.1.2 Sitio de unión de Laulimalida.....	10
2.4.2 Agentes desestabilizantes.....	11
2.4.2.1 Sitio de unión de alcaloides de la Vinca.....	11
2.4.2.2 Sitio de unión de Pironetina.....	12
2.4.2.3 Sitio de unión de Maitansina.....	13
2.4.2.4 Sitio de unión de Colchicina.....	13
2.5 Combretastatina A-4 como agente desestabilizante de la tubulina.....	15
2.6 Importancia de los heterociclos en el desarrollo de fármacos.....	17
2.6.1 Indoles.....	17
2.6.2 Indazoles.....	19
3. ANTECEDENTES	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general.....	24
6.2 Objetivos particulares.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25

7.1	Diseño de los derivados propuestos	25
7.2	Procedimiento para la predicción de propiedades fisicoquímicas	26
7.3	Procedimiento para análisis de acoplamiento molecular	26
7.3.1	Preparación de los ligandos	26
7.3.2	Preparación de la proteína	27
7.3.3	Acoplamiento molecular	27
7.3.3.1	Validación del estudio de acoplamiento molecular	28
7.3.3.2	Acoplamiento molecular en <i>AutoDock 4.2</i>	28
7.3.3.3	Acoplamiento molecular en <i>AutoDock Vina</i>	28
7.3.3.4	Acoplamiento molecular en <i>GOLD</i>	29
7.4	Síntesis de los compuestos	29
7.4.1	Procedimiento para la obtención del 3-bromo-1 <i>H</i> -indol.....	29
7.4.2	Procedimiento para la síntesis del éster borónico	30
7.4.3	Procedimiento general para la obtención del compuesto derivado de indol YPC-2A	31
7.4.4	Procedimiento para la obtención de los precursores derivados de indazol	32
7.4.5	Procedimiento para la obtención de los compuestos derivados de indazol: YPC-1 a YPC-5	33
7.5	Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares	35
7.5.1	Mantenimiento de líneas celulares	35
7.5.2	Conteo celular	36
7.5.3	Aplicación del tratamiento	36
7.5.4	Análisis morfológico de células	36
7.5.5	Ensayo de citotoxicidad con sulforodamina B	36
7.5.6	Análisis de datos	37
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
8.1	Determinación de las propiedades fisicoquímicas	37
8.2	Acoplamiento molecular en <i>AutoDock 4.2</i> , <i>AutoDock Vina</i> y <i>GOLD</i>	39
8.2.1	Validación del acoplamiento molecular	40
8.2.2	Energía de unión ligando-receptor para YPC-1A , YPC-2A , YPC-1–YPC-5 y CA-4	40

8.2.3	Afinidad sobre el sitio de unión de la colchicina para YPC-1A , YPC-2A , YPC-1–YPC-5 y CA-4	42
8.2.4	Interacciones ligando-receptor para YPC-1A , YPC-2A , YPC-1–YPC-5	48
8.3	Síntesis de las moléculas.....	57
8.3.1	Síntesis de derivado de indol: YPC-2A	58
8.3.2	Síntesis de derivados de indazol: YPC-1 a YPC-5	61
8.4	Pruebas en líneas celulares.....	64
8.4.1	Porcentaje de inhibición del crecimiento celular en SK-LU-1 y HeLa..	64
8.4.2	Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀)	65
8.4.3	Observación de cambios morfológicos a través de microscopia de campo claro	66
8.5	Estudios de estructura actividad (SAR) de los compuestos YPC-2A , YPC-1–YPC-5	70
9.	CONCLUSIONES	76
10.	REFERENCIAS	77
11.	ANEXO I	88
	ANEXO I.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de defunciones por tipo de tumor maligno, por grupos de edad y sexo, de acuerdo con lo registrado por el INEGI en 2021 (Defunciones por cada 10 mil habitantes en cada grupo de edad y sexo).....	3
Figura 2. Algunos mecanismos de resistencia a los fármacos en las células cancerosas.....	5
Figura 3. Estructura de los microtúbulos, en donde la β -tubulina queda expuesta en la terminal (+) y α -tubulina en la terminal (-) y su dinámica, donde se lleva a cabo el proceso de polimerización y despolimerización.....	7
Figura 4. Moléculas estabilizantes de los microtúbulos. Paclitaxel (sitio de unión de taxanos) y laulimalida (sitio de unión de Laulimalida).....	9
Figura 5. Moléculas desestabilizantes de los microtúbulos. Vinblastina (sitio de unión de alcaloides de la vinca), maitansina (sitio de unión de maitansina), pironetina (sitio de unión de pironetina) y colchicina (sitio de unión de colchicina).....	11
Figura 6. Representación 3D de los sitios de unión del heterodímero de α/β -tubulina con los agentes estabilizantes y desestabilizantes. La subunidad α se muestra de color azul oscuro y el sitio de unión de pironetina (verde), la subunidad β se muestra de color azul claro y el sitio de unión de colchicina (amarillo), el sitio de unión de taxano (rojo), el sitio de unión de laulimalida (morado), el sitio unión de alcaloides de la vinca (rosa) y el sitio de unión de maitansina (azul).....	14
Figura 7. Estructura e interacciones de la CA-4 con la interfaz α/β -tubulina en 3D de acuerdo con la literatura.....	16
Figura 8. Ejemplos de fármacos derivados de indol e indazol aprobados por la FDA para su uso contra el cáncer.....	20
Figura 9. Productos naturales utilizados como tratamiento contra el cáncer.....	21
Figura 10. Ejemplo de híbridos de CA-4 e isocombretastatina A-4.....	22

Figura 11. Moléculas híbridas derivadas de CA-4 (a), compuesto híbrido de CA-4 y 2,3-difenil-2 <i>H</i> -indazol (b), compuestos híbridos de CA-4 e índol (c, d), compuestos híbridos de CA-4 e indazol (e, f). CA-4 (naranja, derivado de indol (rojo), derivado de indazol (azul)).....	23
Figura 12. Estructura de la CA-4 , compuestos híbridos b y c (obtenido por el grupo de trabajo) y compuestos derivados propuestos. La CA-4 se aprecia en color rosa (anillo A) y azul (anillo B), los grupos -OCH ₃ (color naranja) en las posiciones 5 y 6 del indazol.....	26
Figura 13 Mejores poses de unión para la molécula derivada de indol: YPC-2A (amarillo), y la CA-4 (naranja) con <i>AutoDock 4.2</i> (A), <i>AutoDock Vina</i> (B), <i>ChemPLP score</i> (C) y <i>GOLD score</i> (D).....	43
Figura 14. Mejores poses de unión para la molécula derivada de indazol: YPC-2 (rosa), YPC-3 (verde) y CA-4 (naranja) con <i>AutoDock 4.2</i> (A), <i>AutoDock Vina</i> (B), <i>ChemPLP score</i> (C) y <i>GOLD score</i> (D).....	45
Figura 15. Comparación de las mejores poses de unión ligando-receptor con los tres programas utilizados para las moléculas YPC-1A , YPC-2A , YPC-1–YPC-5 : <i>AutoDock Vina</i> (azul), <i>AutoDock 4.2</i> (verde) y <i>GOLD</i> (<i>ChemPLP score</i> , rojo).....	48
Figura 16. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos YPC-2A (A) y YPC-3 (B) observadas en <i>AutoDock 4.2</i>	50
Figura 17. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos YPC-2A (A), YPC-3 (B) observadas en <i>AutoDock Vina</i>	52
Figura 18. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos YPC-2A (A), YPC-3 (B) observadas en <i>GOLD</i> (<i>ChemPLP score</i>).....	54

Figura 19. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos YPC-2A (A), YPC-3 (B) observadas en <i>GOLD</i> (<i>Gold score</i>).....	56
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2A	59
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2A ..	61
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2	64
Figura 23. Micrografía de células SKLU-1 y HeLa sin tratamiento y células tratadas con el control positivo (CA-4)	67
Figura 24. Micrografía de células SK-LU-1 tratadas con los compuestos YPC-2A , YPC-1–YPC-5 comparando su efecto con respecto a células sin tratamiento.....	68
Figura 25. Micrografía de células HeLa tratadas con los compuestos YPC-2A , YPC-1–YPC-5 comparando su efecto con respecto a células sin tratamiento.....	69
Figura 26. Micrografía de células SK-LU-1 y HeLa tratadas con los compuestos YPC-2 , YPC-3 , YPC-2A , a los que se calculó la CI_{50} (μM), observando cambios morfológicos importantes.....	70
Figura 27. A) Estructura de los compuestos YPC-2A , YPC1 a YPC-5 y CA-4 en la que se marca en color las regiones estructurales que participan en la interacción con el sitio de unión de la α/β -tubulina. B) Regiones estructurales que participan en la interacción con el sitio de unión de la α/β -tubulina y una descripción breve.....	72
Figura 28. Orden decreciente del porcentaje de inhibición observado para la línea celular SK-LU-1 tratadas con los compuestos YPC-2A , YPC-1 a YPC-5	74
Figura 29. Orden decreciente del porcentaje de inhibición observado en la línea celular HeLa para los compuestos YPC-2A , YPC-1 a YPC-5	74

Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto 1a	89
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) del compuesto 1a	89
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2A ...	90
Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2A	90
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-1	91
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2	91
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-3	92
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-4	92
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-5	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas a través del servidor <i>SWISSADME</i>	38
Tabla 2. Valores de RMSD obtenidos para la validación del acoplamiento molecular.....	40
Tabla 3. Resultados obtenidos en el acoplamiento molecular para los compuestos diseñados y CA-4	42
Tabla 4. Comparación de RMSD para los tres programas: <i>AutoDock Vina</i> , <i>AutoDock 4.2</i> y <i>GOLD (ChemPLP score)</i>	47
Tabla 5. Principales interacciones observadas en <i>AutoDock 4.2</i> . para los compuestos y CA-4	51
Tabla 6. Principales interacciones observadas en <i>AutoDock Vina</i> para los compuestos y CA-4	53
Tabla 7. Principales interacciones observadas en <i>GOLD (ChemPLP score)</i> para los compuestos y CA-4	55
Tabla 8. Principales interacciones observadas en <i>GOLD (GOLDscore)</i> . para los compuestos y CA-4	57
Tabla 9. Características físicas de los compuestos sintetizados, punto de fusión y rendimiento obtenido.....	58
Tabla 10. Desplazamientos químicos (δ) en RMN de ^1H para YPC-2A	59
Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ) en RMN de ^{13}C para YPC-2A	60
Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ) en RMN de ^1H para los compuestos YPC-1 a YPC-5	63
Tabla 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular a 50 μM en las líneas celulares SK-LU-1 y HeLa.....	65

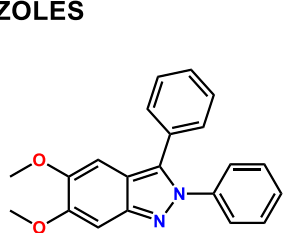
Tabla 14. Valores calculados de Cl_{50} (μM) para los compuestos YPC-2 , YPC-3 y YPC-2A	66
--	----

ÍNDICE DE ESQUEMAS

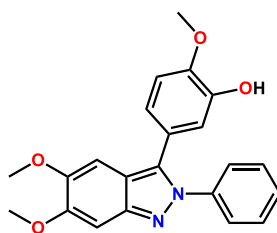
Esquema 1. Ruta de síntesis para la obtención del 3-bromo-1 <i>H</i> -indol.....	30
Esquema 2. Obtención del acetato de 2-metoxi-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenilo por borilación de Miyaura.....	31
Esquema 3. Síntesis de 2,3-difenilindol por acoplamiento de Suzuki-Miyaura.....	32
Esquema 4. Reducción de 2-metoxi-5-nitro fenol por hidrogenación catalítica.....	32
Esquema 5. Metodología general para la formación de 3-bromo-1 <i>H</i> -indazol correspondiente.....	33
Esquema 6. Acoplamiento de Suzuki-Miyaura para la obtención de los compuestos YPC-1 a YPC-5	34

ÍNDICE DE COMPUESTOS SINTETIZADOS

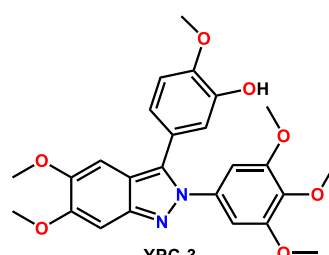
INDAZOLES



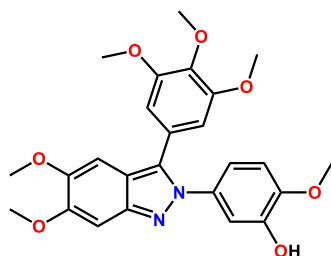
YPC-1
5,6-dimetoxi-2,3-difenil-2*H*-indazol



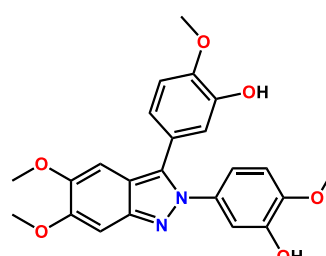
YPC-2
5-(5,6-dimetoxi-2-fenil-2*H*-indazol-3-il)-2-metoxifenol



YPC-3
5-(5,6-dimetoxi-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2*H*-indazol-3-il)-2-metoxifenol

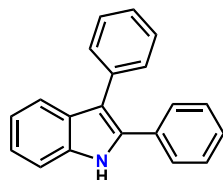


YPC-4
5-(5,6-dimetoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2*H*-indazol-2-il)-2-metoxifenol

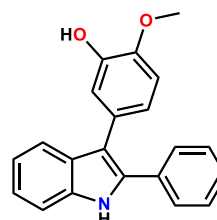


YPC-5
5,5'-(5,6-dimetoxi-2*H*-indazol-2,3-diil)bis(2-metoxifenol)

INDOLES



YPC-1A
2,3-difenil-1*H*-indol



YPC-2A
2-metoxi-5-(2-fenil-1*H*-indol-3-il)fenol

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

α	Alfa	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Å	Angstroms (1×10^{-10} m)	(m)	Señal múltiple
ADN	Ácido desoxirribonucleico	M	Concentración molar (mol/L)
AcOEt	Acetato de etilo	MeOH	Metanol
β	Beta	MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
°C	Grados Celsius	min	Minutos
^{13}C	Carbono-13	mL	Mililitros (1×10^{-3} L)
CA-4	Combretastatina A-4	μL	Microlitros (1×10^{-6} L)
CCF	Cromatografía en capa fina	μM	Concentración micromolar (1×10^{-6} M)
CDCl_3	Cloroformo deuterado	mM	Concentración milimolar (1×10^{-3} M)
CI_{50}	Concentración inhibitoria 50	NBS	<i>N</i> -bromosuccinamida
δ	Desplazamiento químico	nm	Nanometro
Da	Dalton	pH	Potencial de hidrógeno (logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio)
DCM	Diclorometano	p.f.	Punto de fusión
DMEM	Medio Eagle Modificado Dulbecco	ppm	Partes por millón (1×10^{-6})
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida	RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
DMSO	Dimetilsulfóxido	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
(d)	Señal doble	(s)	Señal simple
(dd)	Señal doble de dobles	(t)	Triplete
EtOH	Etanol	t.a.	Temperatura ambiente
FBS	Suero fetal bovino	TCA	Ácido tricloroacético
g	Gramos	TMP	3,4,5-trimetoxifenilo
GTP	Guanosin trifosfato		
h	Horas		
^1H	Hidrógeno-1		
HA	Aceptor de puente de hidrógeno		
HD	Donador de puente de hidrógeno		
Hz	Hertz		

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado como la primera causa de muerte a nivel mundial, con un estimado de 10 millones de muertes en 2020 [1]. Se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales y su progresión puede derivar en la alteración de los procesos biológicos de células sanas [2]. Puede comenzar su desarrollo en casi cualquier órgano o tejido y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y/o diseminarse a otros órganos (metástasis), que es una de las principales causas de muerte [1,3].

Hoy en día, el tratamiento más prometedor es la quimioterapia [4]. Sin embargo, la resistencia a la quimioterapia limita la eficacia del tratamiento farmacológico, ya que los tumores pueden ser intrínsecamente resistentes o desarrollar resistencia utilizando diferentes mecanismos, y la toxicidad del tratamiento administrado aumenta [3]. El desarrollo de nuevas terapias dirigidas puede dar paso a combatir la resistencia adquirida durante el tratamiento. Uno de los objetivos farmacológicos más prometedores de los fármacos contra el cáncer son los microtúbulos, constituidos por tubulina α y β , que son importantes en la división celular [5].

En el presente trabajo se plantea el diseño de nuevos derivados híbridos de indoles (**YPC-1A** y **YPC-2A**) e indazoles (**YPC-1–YPC-5**) con combretastatina A-4 (**CA-4**); tomando en cuenta el trabajo realizado en el grupo de “síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas”, donde se realizaron híbridos de indazoles con **CA-4** obteniendo un compuesto con actividad citotóxica de importancia y con afinidad por la tubulina [6]. Como apoyo en el diseño de las moléculas, se realizó acoplamiento molecular utilizando tres programas *Autodock 4.2*, *AutoDock Vina* y *GOLD* (funciones de puntuación *ChemPLP score* y *GOLD Score*), empleando la interfaz de la α/β -tubulina como sitio de unión.

Se realizó la síntesis de los compuestos y su caracterización por resonancia magnética nuclear. Se realizaron pruebas de citotoxicidad en líneas celulares SK-LU-1 (cáncer de pulmón) y HeLa (cáncer cervicouterino), se determinó el porcentaje de inhibición (50 μ M) para los compuestos sintetizados por ensayo de sulforodamina B, así como la Cl_{50} para los compuestos **YPC-2A**, **YPC-2** y **YPC-3**.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer: principal problema en la actualidad

El cáncer es considerado como la principal causa de muerte a nivel mundial, con un estimado de 10 millones de muertes en 2020 [1]. El cáncer se puede definir como el crecimiento descontrolado de células anormales y la alteración dinámica del genoma, dando lugar a características cancerosas en las células normales. Además, la progresión del cáncer implica la afectación de procesos biológicos de células sanas, se presenta la invasión de tejidos cercanos y la metástasis de tejidos lejanos [2, 3].

Por lo que, existen tratamientos comunes contra el cáncer como la radioterapia, la cirugía, terapia combinada, terapia con láser, y hoy en día la opción más prometedora contra el cáncer, la quimioterapia [4]. Uno de los problemas que presenta la quimioterapia es que, tras la administración del fármaco, las células tumorales del paciente adquieren resistencia, el 90% de las fallas de la quimioterapia se dan durante la invasión o la metástasis; además de la falta de selectividad y el aumento de los efectos adversos [3].

En México, el cáncer es problema de salud pública, debido a que es una de las principales causas de muerte en la población. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) en 2021 registraron 1,122,249 defunciones, de las cuales 8 % fue por tumores malignos (90,123). La tasa de defunciones por esta causa aumentó, registrándose 7.06 defunciones por cada 10 mil personas. Para los hombres de entre 30 y 59 años (**Figura 1 apartado A**), destacaron las defunciones por tumor maligno del colon, del recto y del ano con una tasa de 0.60 defunciones por cada 10 mil varones, mientras que en mujeres (**Figura 1 apartado B**) tumor maligno de la mama, así como el del cuello del útero, con tasas de 1.52 y 0.88 defunciones por cada 10 mil mujeres, respectivamente. Para las personas adultas mayores (60 años y más), en hombres (**Figura 1 apartado C**) tumor maligno de la próstata con tasa de 10.59 y en mujeres (**Figura 1 apartado D**) tumor maligno de la mama con 4.81 defunciones por cada 10 mil mujeres (datos consultados en enero 2024) [7].

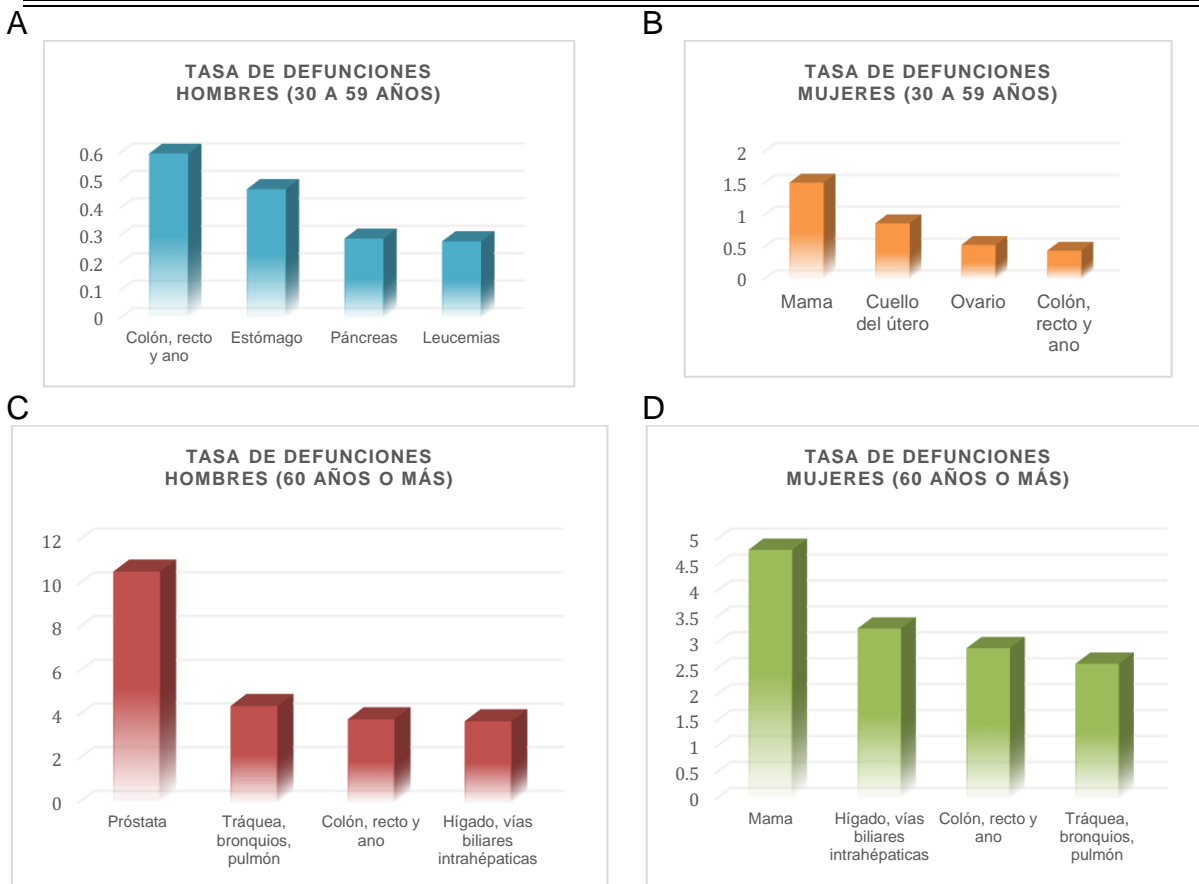


Figura 1. Tasa de defunciones por tipo de tumor maligno, por grupos de edad y sexo, de acuerdo con lo registrado por el INEGI en 2021 (Defunciones por cada 10 mil habitantes en cada grupo de edad y sexo).

2.2 Quimioterapia y la resistencia a fármacos

La quimioterapia se refiere a la administración de sustancias químicas citotóxicas, es decir matar células, con el objetivo de erradicar el tumor o reducir la carga tumoral y mejorar la calidad de vida de los pacientes [5].

Los mecanismos por los cuales los fármacos citotóxicos actúan en las células para inducir la muerte celular y/o detener el crecimiento celular, se han investigado principalmente en líneas de células tumorales. Sin embargo, existen muchas diferencias entre estos sistemas modelo y el cáncer en pacientes [5]. La resistencia a medicamentos se produce cuando las enfermedades se vuelven tolerantes a los tratamientos farmacéuticos, incluyendo el cáncer. Asimismo, hay diferentes tipos de cáncer que son inicialmente susceptibles a la quimioterapia, sin embargo, con el

tiempo pueden desarrollar resistencia [8]. Por lo tanto, los tumores pueden ser intrínsecamente resistentes a la quimioterapia antes del tratamiento, o adquirirse durante el tratamiento en tumores que inicialmente son sensibles a la quimioterapia [4].

Uno de los mecanismos más estudiados de resistencia a fármacos contra el cáncer se enfoca en reducir la acumulación de fármacos mejorando el flujo de salida, por lo que las proteínas de la familia de transportadores del sitio de unión a ATP (conocidas como ABC) permiten este flujo y son reguladoras en las membranas plasmáticas de las células sanas. La estructura de estos varía de una proteína a otra y se clasifican por la presencia de dos dominios distintos: uno de unión a nucleótidos altamente conservado y uno transmembrana más variable [8].

Hay tres transportadores relacionados con células cancerosas resistentes a fármacos: la proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1), la proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP1) y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP). Cuando un sustrato determinado se une al dominio transmembrana, la hidrólisis del ATP en el sitio de unión del nucleótido genera un cambio en la conformación que empuja al sustrato fuera de la célula (mecanismo de eflujo). Relacionado a lo anterior, la resistencia a múltiples fármacos se ha relacionado con mayor frecuencia con la sobreexpresión de glicoproteína-P, que es producida por MDR1, y por tanto, se ha observado que se sobreexpresa en muchas líneas celulares resistentes a los fármacos y en varias leucemias y tumores sólidos [4, 8].

Hay otros factores que afectan la sensibilidad a los medicamentos; por ejemplo, el aumento de la salida de fármacos y la disminución de la entrada de fármacos, inactivación de fármacos, alteraciones en el objetivo del fármaco y evasión de la apoptosis, así como la alteración del metabolismo del fármaco, los cambios epigenéticos, los cambios en los objetivos de los fármacos y la mejora de la reparación del ADN (**Figura 2**) [4,9]. Incluso se sabe que, la participación de las células troncales de cáncer o células madre cancerosas, en la formación de células

cancerosas metastásicas, explica por qué el cáncer puede recaer en sitios distantes después de un tratamiento y una remisión aparentemente exitosa [8, 9].

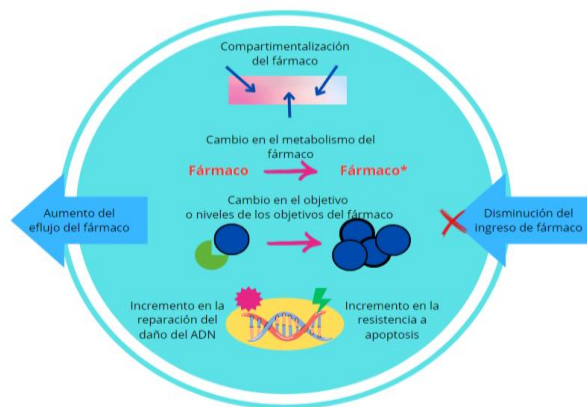


Figura 2. Algunos mecanismos de resistencia a los fármacos en las células cancerosas.

Con lo anterior, se tiene la necesidad de nuevos fármacos más eficaces en la quimioterapia contra el cáncer. Por lo que, las estrategias utilizadas actualmente para el desarrollo de fármacos citotóxicos se basan en observaciones empíricas, diseño racional de fármacos basado en blancos farmacológicos, síntesis de análogos de fármacos activos ya conocidos y el uso de sistemas de laboratorio para selección de propiedades citotóxicas entre los productos químicos disponibles [10, 11, 12].

2.3 Microtúbulos: dianas terapéuticas contra el cáncer

Los microtúbulos son polímeros no covalentes que constituyen el citoesqueleto de la célula, constituidos principalmente por un heterodímero de tubulina α y β , formando una red filamentosa que da forma a las células. Además, los microtúbulos son altamente dinámicos, es decir, un rápido intercambio de subunidades entre polímeros y una reserva de tubulina soluble [13, 14]. Esta característica es importante para la rápida reorganización del sistema de microtúbulos durante la transición entre la interfase y la mitosis y durante el movimiento celular [13]. Además, desempeñan actividades celulares importantes, como la mitosis, el transporte de vesículas intracelulares, la organización y el posicionamiento de los

orgánulos membranosos y la determinación de la forma y la motilidad de las células [14].

El componente principal de los microtúbulos es la α/β -tubulina y una variedad de componentes menores conocidos como proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), cinasas y fosfatasas, así como interacciones coordinadas con otros componentes del citoesqueleto, como filamentos de actina y sitios de adhesión que contienen integrinas. Por lo tanto, son plegados y desplegados por chaperonas como un complejo heterodímero [15, 18, 21]. Los monómeros de α/β -tubulina (con masa de 50,000 Da) son proteínas de aproximadamente 450 aminoácidos cada una y son idénticas en aproximadamente un 50% a nivel de aminoácidos [14, 19].

Dando lugar a un ensamblaje que va de cabeza a cola para formar un protofilamento polar con tubulina- α expuesta en un extremo y tubulina- β en el otro. Asimismo, los protofilamentos se van ensamblando entre sí para formar un cilindro hueco, por lo que en células eucariotas se forman microtúbulos con 13 protofilamentos con diámetros interno y externo de 12 nm y 25 nm [13]. La estructura está organizada de manera polar, de modo que la subunidad de tubulina α está expuesta en un extremo (extremo negativo), mientras que la subunidad de tubulina β está expuesta en el otro (extremo positivo). Por ende, los dos polos difieren en sus propiedades dinámicas, siendo el extremo positivo más dinámico que el extremo negativo (**Figura 3**) [18, 21].

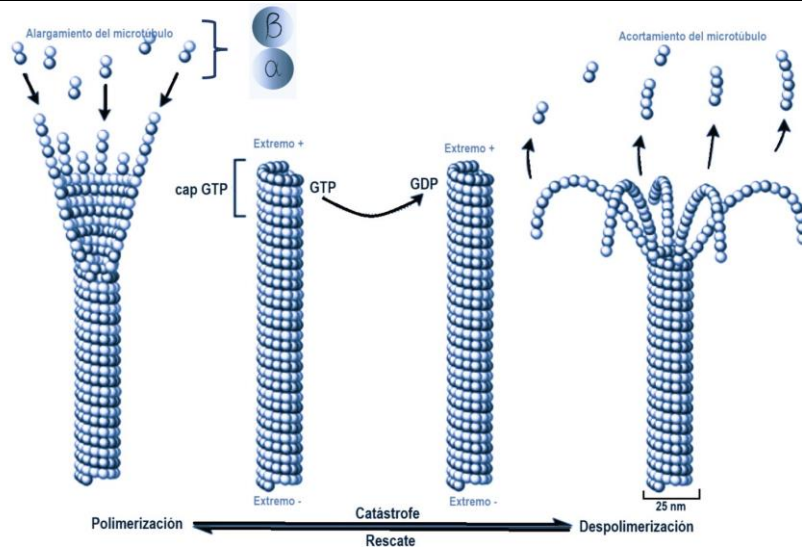


Figura 3. Estructura de los microtúbulos, en donde la β -tubulina queda expuesta en la terminal (+) y α -tubulina en la terminal (-) y su dinámica, donde se lleva a cabo el proceso de polimerización y despolimerización.

Los microtúbulos están compuestos por múltiples isoformas de tubulina, con diversas modificaciones postraduccionales conservadas evolutivamente. Esta diversidad de tubulina altera las propiedades intrínsecas de los microtúbulos, como su dinámica y mecánica, así como el reclutamiento y la actividad de los motores y las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP). En los seres humanos, los microtúbulos se componen de combinaciones mixtas de ocho isotipos de tubulina α y siete isotipos de tubulina β , que están codificados por diferentes genes en distintos cromosomas y poseen tejidos específicos (son importantes para la función de conjuntos de microtúbulos especializados en espermatozoides, plaquetas y neuronas). Los isotipos de tubulina comparten un alto grado de homología estructural, pero se distinguen entre sí por secuencias muy divergentes. Debido a que, los dominios *N*-terminal e intermedio de la proteína forman un cuerpo de tubulina globular rígido y altamente conservado que se apila para formar protofilamentos, mientras que la cola *C*-terminal de la proteína es un péptido altamente desordenado de 18 a 24 aminoácidos de longitud [15 16].

Se ha observado que los microtúbulos compuestos por el isotipo de tubulina β III son más dinámicos que los microtúbulos compuestos por isotipos de tubulina β II o β IV, que están asociados con microtúbulos más estables, por lo que la expresión

alterada de tubulinas β I, β II, β IVa y β V también se ha asociado con la resistencia a fármacos y resultados negativos en varios tipos de cáncer [13, 15, 16].

De acuerdo con su participación en los procesos biológicos celulares básicos, las perturbaciones en las modificaciones de la tubulina y las enzimas que las introducen están asociadas con cánceres, trastornos del neurodesarrollo y neurodegenerativos [17]. Con lo anterior, la tubulina es capaz de interactuar con una gran cantidad de proteínas y moléculas pequeñas como nucleótidos y fármacos. Además, la tubulina es una GTPasa, que participa en la hidrólisis de GTP, ya que cada subunidad de tubulina α y β puede albergar una molécula de guanosina-5'-trifosfato (GTP) [22].

El GTP unido a α no se hidroliza ni se intercambia, pero el GTP unido a la tubulina β puede hidrolizarse a GDP (guanosina difosfato) cuando la tubulina se incorpora a la red de microtúbulos y se intercambia nuevamente a GTP en el dímero de tubulina despolimerizado. El aporte de energía procedente de la hidrólisis de GTP sirve para generar dinámicas de desequilibrio, y es el mecanismo fisicoquímico básico en la organización y motilidad dependiente de los microtúbulos (**Figura 3**) [16,19].

Los agentes que interfieren con la dinámica de los microtúbulos inhiben la capacidad de las células para completar con éxito la mitosis, por lo tanto, limitar la proliferación. Los fármacos que inhiben la dinámica de los microtúbulos se unen a la tubulina y, en concentraciones elevadas, provocan un aumento o disminución de la masa de microtúbulos en interfase del ciclo celular. Estos compuestos se clasifican como estabilizadores o desestabilizadores de microtúbulos, respectivamente [18]. Por consiguiente, ambas clases de fármacos inhiben la mitosis a través de un mecanismo similar de ralentización de la dinámica de los microtúbulos, lo que da como resultado la detención mitótica y la apoptosis [20].

2.4 Agentes estabilizadores y desestabilizadores de tubulina

2.4.1 Agentes estabilizantes

Son agentes capaces de promover estructuras poliméricas de tubulina incluso cuando la molécula GDP desfavorable está unida, refiriéndose a que cuando se está

llevando a cabo la hidrólisis de GDP el núcleo del protofilamento inestable se acorta rápidamente a medida que las subunidades de tubulina-GDP se liberan de los extremos del microtúbulo. y por tanto, son más eficaces que las proteínas endógenas asociadas a los microtúbulos para estabilizarlos. Hay varias categorías de fármacos como los taxanos, epotilonas y agente del sitio de unión de laulimalida, como se ejemplifica en la **Figura 4** [22].

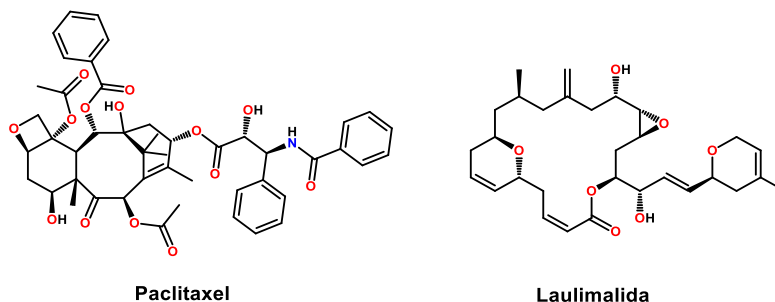


Figura 4. Moléculas estabilizantes de los microtúbulos. Paclitaxel (sitio de unión de taxanos) y laulimalida (sitio de unión de Lulimolide).

2.4.1.1 Sitio de unión de Taxanos

Son agentes dirigidos a microtúbulos que estabilizan los protofilamentos de β -tubulina unidos al GDP dándoles una conformación que se asemeja a la estructura más estable unida al GTP. La unión de taxanos produce un cambio en el equilibrio de los heterodímeros de tubulina de la forma soluble a la polimerizada, lo que resulta en la agrupación de microtúbulos en la interfase [18, 23]. Un ejemplo es el paclitaxel (Taxol, Bristol-Meyers Squibb), tratamiento de varias neoplasias sólidas, incluidas las de mama, ovario y próstata. Por lo que, induce la formación de microtúbulos que contienen 12 protofilamentos en lugar de los 13 típicos [24].

Los taxanos presentan limitantes como las toxicidades de la dosis de la inmunosupresión y la neuropatía periférica, así como la resistencia a los medicamentos inherente y adquirida. La forma de resistencia a taxanos más relevante es la sobreexpresión del transportador de fármacos del sitio de unión a ATP (ABC) de la glicoproteína-P. La sobreexpresión intrínseca de glicoproteína-P en el hígado, el riñón y el tracto intestinal ha limitado el uso de taxanos en tumores

derivados de estos tejidos [24]. Por lo que, para mejorar la farmacología del paclitaxel, se introdujo su análogo semisintético, el docetaxel, taxano de segunda generación, más soluble en agua y más activo que el paclitaxel contra la proliferación de células cancerosas; se usa para tratar tumores malignos de mama y próstata [18, 24].

Asimismo, el paclitaxel eleva la nucleación y el alargamiento de los microtúbulos, además el sitio de unión está en la subunidad β y está ubicado dentro de la superficie del polímero. Por otro lado, facilita el ensamblaje de tubulina, lo que da como resultado polímeros de tubulina muy resistentes con microtúbulos más cortos, la mayoría de las células muestran conjuntos de microtúbulos anormales que aparecen en láminas y agrupados [25, 26].

2.4.1.2 Sitio de unión de Laulimalida

Laulimalida es un producto natural, es un macrólido de 18 miembros que contiene nueve carbonos quirales y dos anillos de dihidropirano y contiene un epóxido transdisustituido y un 2,3-zenoato. Asimismo, tiene actividad citotóxica, aislado de esponjas marinas (*Hyattella sp.* y *Cacospongia mycofijiensis*), estructuralmente diferente a los taxanos. Sin embargo, al igual que el paclitaxel, la laulimalida se une a la tubulina mejorando el ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos [22, 27, 28].

Esta molécula, muestra una potente inhibición de la proliferación celular contra numerosas líneas celulares cancerosas, con valores de CI_{50} en el rango de nM. Además, a diferencia del paclitaxel, la laulimalida también es muy potente contra líneas celulares cancerosas multirresistentes (MDR) que sobreexpresan la glicoproteína P, lo que sugiere que son sustratos deficientes para el transporte por esta proteína [27-29].

Su mecanismo de acción se basa en una reorganización dependiente de la dosis de la red de microtúbulos celulares y lleva a las células a detenerse en la etapa G_2/M del ciclo celular, aumentando la densidad de los microtúbulos en interfase con la formación de haces en el citoplasma de las células en interfase y husos mitóticos

anormales. Por otro lado, induce la convolución nuclear y la formación de múltiples micronúcleos, y los polímeros de tubulina inducidos por laulimalida son más largos, a comparación de los polímeros inducidos por paclitaxel [29, 30].

2.4.2 Agentes desestabilizantes

Son agentes que interfieren con la dinámica de la tubulina. Incluyen fármacos que se unen al sitio de unión del alcaloide de la vinca y al sitio de unión de la colchicina, o alquilan grupos sulfhidrido de la tubulina [22, 23].

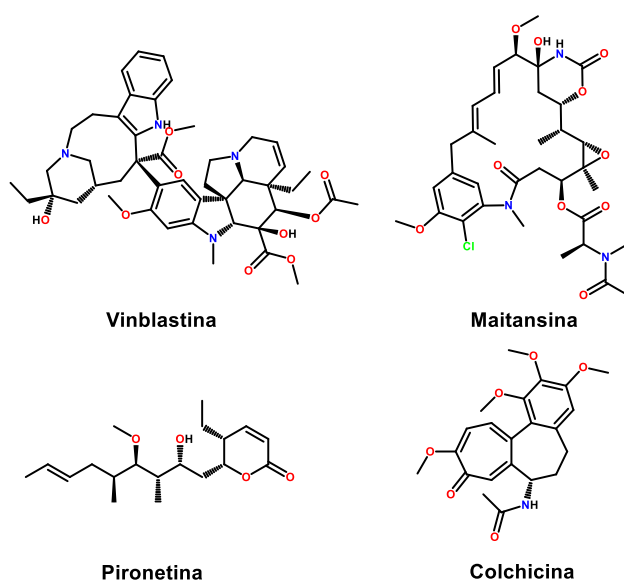


Figura 5. Moléculas desestabilizantes de los microtúbulos. Vinblastina (sitio de unión de alcaloides de la vinca), maitansina (sitio de unión de maitansina), pironetina (sitio de unión de pironetina) y colchicina (sitio de unión de colchicina).

2.4.2.1 Sitio de unión de alcaloides de la Vinca

Los alcaloides de la vinca son productos naturales obtenidos de la planta bígaro de Madagascar, *Catharanthus roseus* y tienen efectos hipoglucemiantes y citotóxicos, además, se utilizan para tratar la diabetes, la presión arterial alta y para combatir el cáncer. Hay cuatro alcaloides principales de la vinca de uso clínico: vinblastina, vinorelbina, vincristina y vindesina [31].

El mecanismo de inhibición de la polimerización o ensamblaje de tubulina fue descrito desde 1965. Los alcaloides de la Vinca detienen el ciclo celular en metafase mediante una unión rápida y reversible a la subunidad β -tubulina en una región llamada dominio Vinca. La unión de los alcaloides de la vinca a estos sitios interrumpe la congregación de los microtúbulos, pero uno de los efectos más importantes de las bajas concentraciones del fármaco puede ser la disminución de las tasas de crecimiento y acortamiento en el extremo de ensamblaje de los microtúbulos, lo que puede causar supresión de la función [32, 33].

La vincristina se combina con otros fármacos para tratar la leucemia linfoblástica aguda y tanto en los linfomas de Hodgkin como en los no Hodgkin. Los alcaloides de la vinca son la segunda clase de medicamentos contra el cáncer más utilizados y permanecerán entre las terapias principales contra el cáncer [34, 35].

2.4.2.2 Sitio de unión de Pironetina

El sitio de unión de la pironetina se encuentra exclusivamente dentro de la α -tubulina. La pironetina y sus derivados dimetílicos desestabilizan la polimerización de los microtúbulos e impiden la progresión mitótica [36]. La pironetina (**Figura 8**) es el único producto natural caracterizado cristalográficamente para unirse únicamente a α -tubulina. Es un policétido aislado del caldo de fermentación y la pasta celular de *Streptomyces prunicolor* y *Streptomyces s.* [37].

Estos ligandos se unen a un sitio hidrofóbico en la subunidad de la α -tubulina, adyacente a la interfaz de los dímeros de α/β -tubulina. Además, se encargan del desmontaje de los protofilamentos de los microtúbulos interfiriendo los contactos longitudinales entre dímeros. La pironetina se une a Cys³¹⁶ de tubulina α por adición de Michael. Además, debido a la proximidad de Lys³⁵² a Cys³¹⁶, es posible que estos residuos estén involucrados en la transferencia de protones, potenciando la unión de pironetina. Debido a su peculiar sitio de unión, estos compuestos pueden ser eficaces para el tratamiento de tumores con resistencia a los fármacos dirigidos a la β -tubulina [38, 39].

2.4.2.3 Sitio de unión de Maitansina

La maitansina (**Figura 8**) es una estructura macrólido de 19 miembros unida a un anillo de benceno clorado, aislado del arbusto *Maytenus ovatus*. El efecto antimitótico de la maitansina se ha atribuido a su capacidad para inhibir el ensamblaje de microtúbulos mediante la unión a tubulina, cerca del sitio de unión de vinblastina [40, 41].

La maitansina es eficaz *in vivo* contra el carcinoma de pulmón de Lewis y los tumores sólidos de melanocarcinoma murino B16 y tiene actividad antileucémica contra la leucemia linfocítica murina. Sin embargo, su utilidad en la clínica se ha visto obstaculizada por efectos secundarios graves y escasa eficacia [40].

Los datos bioquímicos y de mutagénesis de la maitansina consiguieron que este fármaco se aprobara por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama avanzado. La maitansina se une al lado expuesto de la subunidad β -tubulina, por lo que funciona bloqueando la interacción del protofilamento longitudinal, ya sea inhibiendo la adición de dímeros o mediante la formación de complejos no funcionales con β -tubulina. A diferencia de los alcaloides de la Vinca, la maitansina impide la rotación correcta de las subunidades β cargadas de GTP en los extremos negativos de los microtúbulos [36, 41].

2.4.2.4 Sitio de unión de Colchicina

La colchicina, es un producto natural obtenido de *Colchicum autumnale* y *Gloriosa superba*, utilizada en el tratamiento de enfermedades autoinflamatorias y gota, también tiene aplicación en otras enfermedades como pseudogota, fiebre mediterránea familiar, amiloidosis, cirrosis hepática y biliar. Por lo que, presenta actividad antiinflamatoria, antimitótica y antifibrótica [35, 42].

La colchicina fue el primer agente natural de interacción con β -tubulina de esta clase [43]. La interacción en alta concentración con β -tubulina desestabiliza los microtúbulos y conduce a las células a la apoptosis, sin embargo, no se utiliza como fármaco anticanceroso debido a su neurotoxicidad y escasa solubilidad [22, 44]. Los

compuestos que se unen al sitio de la colchicina tienen potencial para eludir varios mecanismos de resistencia a múltiples fármacos, como la sobreexpresión de los transportadores ABC, así como la sobreexpresión del gen MDR1, que codifica la bomba de salida del fármaco de la glicoproteína-P, otros mecanismos que incluyen mutaciones en la tubulina y la sobreexpresión de la isoforma β III y además, muestran actividad de alteración vascular para prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor [45].

La colchicina mostró necrosis hemorrágica en tumores experimentales, sin embargo, la ventana terapéutica fue muy limitada y los estudios se redujeron debido su toxicidad. Por lo que, en los últimos años, se han aislado varios compuestos como las combretastatinas que muestran una similitud estructural con la colchicina y poseen una mayor afinidad por el sitio de unión de la colchicina en la tubulina que la propia colchicina. Por otro lado, también se ha descrito que la colchicina, a comparación de las combretastatinas, se une de manera irreversible a la tubulina, es un factor importante para considerar en el diseño de fármacos. [46, 47].

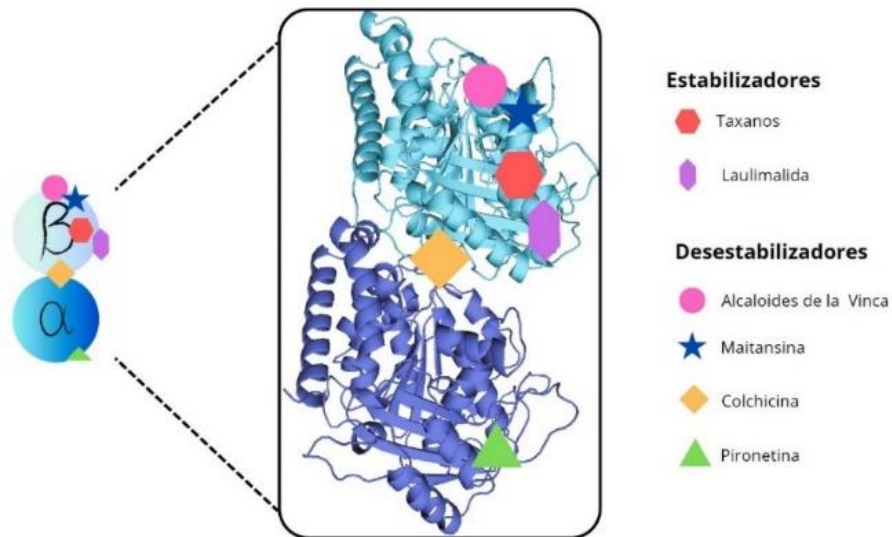


Figura 6. Representación 3D de los sitios de unión del heterodímero de α/β -tubulina con los agentes estabilizantes y desestabilizantes. La subunidad α se muestra de color azul oscuro y el sitio de unión de pironetina (verde), la subunidad β se muestra de color azul claro y el sitio de unión de colchicina (amarillo), el sitio de unión de taxano (rojo), el sitio de

unión de laulimalida (morado), el sitio unión de alcaloides de la vinca (rosa) y el sitio de unión de maitansina (azul).

2.5 Combretastatina A-4 como agente desestabilizante de la tubulina

La combretastatina A-4 (**CA-4**), fue aislada de un sauce sudafricano *Combretum caffrum*, ha demostrado tener una citotoxicidad elevada contra una variedad de células cancerosas, incluidas las líneas celulares de cáncer resistentes a múltiples fármacos. Además, ha mostrado tener similitud estructural con la colchicina y posee una alta afinidad por el sitio de unión a la colchicina [48, 49]. Se realizaron estudios para determinar la afinidad de los isómeros *cis* y *trans* de la **CA-4**, demostrando que la interacción tubulina-*cis-CA-4* es más estable que tubulina-*trans-CA-4* mediante la unión de $\Delta G_{\text{unión } trans-cis} = -5,5 \pm 1 \text{ kcal/mol}$, que se obtiene a través de un ciclo termodinámico para calcular la diferencia en la energía libre de unión, $\Delta\Delta G_{\text{unión } trans-cis}$, entre los isómeros *trans-CA-4* y *cis-CA-4* en agua (sin unir) y en complejo con tubulina (unida). y con las estadísticas de Boltzmann, esta diferencia de energía se traduce en un aumento de aproximadamente 10,000 veces en la afinidad de unión de la tubulina por *cis-CA-4* respecto a *trans-CA-4* [53].

Se ha observado en estudios *in vitro* que una exposición corta a **CA-4** produce efectos antiproliferativos/citotóxicos a largo plazo contra las células endoteliales en proliferación, pero no contra las células que estaban inactivas antes y durante la exposición al fármaco, además se observó que el efecto citotóxico selectivo del **CA-4** está mediado por la inducción de la apoptosis, además de que presenta actividad anti-vascular evitando la progresión de los tumores. Por lo que, la **CA-4** muestra una potente actividad anticancerosa, inhibe la polimerización de tubulina con una CI_{50} de 1.0 μM y el crecimiento de células cancerosas MCF-7 (cáncer de mama) con una CI_{50} de 13 μM . Con lo anterior, los análogos de **CA-4** son un objetivo como posible candidato contra el cáncer [22, 49, 50].

Estudios previos sobre la relación estructura-actividad de **CA-4** mostraron que la presencia de un doble enlace de configuración *cis* en el puente C-2 es necesaria para una alta actividad citotóxica, así como el 3,4,5-trimetoxi-sustituido del anillo A

y el 4-metoxi sustituido del anillo B son importantes para la citotoxicidad y la unión en el sitio de la colchicina [51].

En el complejo tubulina-**CA-4**, se observa que en el anillo A con 3,4,5-metoxi-sustituido hay interacciones hidrofóbicas formado por los residuos β Val²³⁸, β Cys²⁴¹, β Leu²⁴², β Leu²⁴⁸, β Ala²⁵⁰, β Leu²⁵⁵, β Ala³¹⁶, β Ile³¹⁸, β Ala³⁵⁴ y β Ile³⁷⁸, mientras que en el anillo B sustituido con 3'-hidroxi-4'-metoxi se encuentra β Asn²⁵⁸ y β Lys³⁵². Se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas con los residuos α Thr¹⁷⁹, α Ala¹⁸⁰, α Val¹⁸¹ β Met²⁵⁹, β Ala³¹⁶ y β Asn³⁴⁹. Y se forman dos enlaces de hidrógeno entre el 3'-OH y la amida de la cadena principal de α Val¹⁸¹ y α Thr¹⁷⁹ (**Figura 7**) [52, 53, 54].

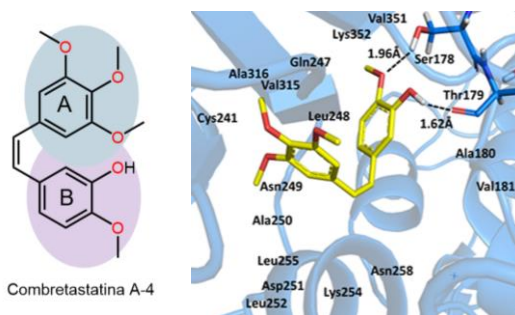


Figura 7. Estructura e interacciones de la **CA-4** con la interfaz α/β -tubulina en 3D de acuerdo con la literatura [54].

Al investigar el uso de combretastatina A-4 como posible tratamiento contra el cáncer, no muestra la actividad esperada *in vivo* debido posiblemente a su pobre biodisponibilidad causada por su baja solubilidad y la inestabilidad de su conformación *cis*, que cambia fácilmente para formar el isómero *trans*. Con lo anterior, se han sintetizado y caracterizado varios derivados de **CA-4**, ya que su estructura química permite realizar un gran número de modificaciones [56].

La modificación estructural de **CA-4** se refiere al anillo A o B, y al doble enlace del puente de eteno. Se han realizado análisis SAR (relación estructura-actividad), el cual mostró que la presencia de un anillo A sustituido con 3,4,5-trimetoxi, un anillo B sustituido con 4-metoxi y un doble enlace en la configuración *cis* son cruciales para la unión de tubulina y la acción antiproliferativa de **CA-4**. La presencia del grupo hidroxilo en el anillo B no es necesaria para la adecuada actividad del compuesto,

lo que lo convierte en un lugar interesante para llevar a cabo la modificación de la estructura química [56, 57].

Se han realizado modificaciones estructurales a **CA-4**, agregando grupos fosfato, dando característica de profármacos de las combretastatinas, y se ha observado que muestran una mejor solubilidad acuosa y son metabolizados a sus formas activas por la fosfatasa, que ejerce una alta actividad en el entorno del tumor. Un ejemplo es Zybrestat (CA-4P o fosbretabulina), que tiene actividad antineoplásica de modelos tumorales realizados en estudios preclínicos y actualmente se encuentra en ensayos clínicos de Fase III. Adicional a lo anterior, existen otros fármacos derivados de **CA-4** que se encuentran actualmente en estudios preclínicos y clínicos como posibles candidatos a fármacos [56].

2.6 Importancia de los heterociclos en el desarrollo de fármacos

Los heterociclos son compuestos cíclicos, en los que uno o más átomos de carbono del anillo son reemplazados por heteroátomos como nitrógeno, azufre y oxígeno. [58]. Asimismo, los heterociclos que contienen nitrógeno y azufre han logrado tener relevancia en la síntesis orgánica debido a su alta estabilidad y a sus características fisicoquímicas. Sumado a lo anterior, heterociclos que contienen nitrógeno de cinco miembros son importantes en la mayoría de las moléculas de fármacos sintéticos [59, 61].

La capacidad de los heterociclos para participar en una amplia gama de interacciones intermoleculares, como interacciones de apilamiento π , capacidad donadora y aceptora de enlaces de hidrógeno, enlaces de coordinación de metales, así como fuerzas hidrofóbicas y de *Van der Waals*, les permite tener interacciones mejoradas en los sitios de unión del inhibidor de los diferentes objetivos [60].

2.6.1 Indoles

El indol es una molécula bicíclica plana en la que el anillo de benceno está fusionado a través de las posiciones 2 y 3 del anillo de pirrol que contiene nitrógeno. Tiene 10 electrones π (8 en los dobles enlaces y 2 de los pares libres de electrones en el

nitrógeno), es de naturaleza aromática según la regla de Huckel. Debido a la deslocalización del exceso de electrones π , el indol sufre fácilmente reacciones de sustitución electrofílica similares al anillo de benceno [61].

Además, son muy reactivos con ácidos fuertes debido a su basicidad débil y, debido a los cálculos de orbitales moleculares, la posición 3 del indol tiene la densidad electrónica más alta y es la posición más reactiva para reacciones de sustitución electrofílica. Dado que, el enlace *N-H* en el indol es ligeramente ácido, sufre reacciones de sustitución en condiciones básicas [61, 62].

El indol está integrado en las proteínas en forma de aminoácido triptófano, además es la base de fármacos como la indometacina y proporciona la estructura principal de los alcaloides del indol, que son compuestos biológicamente activos de plantas como la estricnina y el LSD [63]. Adicional a lo anterior, se ha descubierto que los alcaloides indol, vallesiacotamina e isovallesiacotamina aislados de los frutos de *Anthocephalus cadamba* exhiben una potente actividad anticancerosa y los alcaloides indol de productos naturales marinos muestran numerosas actividades biológicas, incluidas citotóxicas, antivirales, antimicrobianas y antiparasitarias, antiinflamatorio, actividad antagonista de la calmodulina y actividad antitopoisomerasa-I [64].

Además, los indoles se encuentran en importantes moléculas de fármacos sintéticos, como inhibidores de la proteasa 3CL del coronavirus del SARS, actividad anti-VIH, antituberculosa, anticonvulsivante y coinfección VIH-TB, incluyendo actividades involucradas; contra el cáncer, antihipertensivos, antidepresivos, como agentes antipsicóticos, antiemético, analgésico, antiasmático, antivirales, antiarrítmico. En la **Figura 8** se muestran ejemplos de fármacos derivados de indol [65, 66].

Con lo anterior, el indol ha atraído la atención de los investigadores y sus derivados se han convertido en un área de investigación debido a sus propiedades farmacológicas. Se considera entre las "estructuras privilegiadas" que se unen a múltiples receptores con alta afinidad, lo que lleva al desarrollo de nuevos fármacos

bioactivos, por ejemplo, se utiliza para el diseño y desarrollo de agentes anticancerosos basados en objetivos [64, 67].

2.6.2 Indazoles

Emil Fisher define el indazol como un anillo de pirazol fusionado con el anillo de benceno, que también se denomina moléculas heterocíclicas de benzopirazol o isoindazolona. El indazol presenta tres formas tautoméricas que incluyen *1H*-indazol, *2H*-indazol y *3H*-indazol. A diferencia de las formas *2H* o *3H*, el *1H*-indazol es termodinámicamente estable y es el tautómero predominante. Los derivados de *2H*-indazol son bases más fuertes que los derivados de *1H*-indazol, lo que da como resultado que la afinidad de los protones del nitrógeno del anillo para los derivados de indazol es mayor para el *2H*- que para el *1H*-indazol [68 69].

De acuerdo con la investigación de Kuhn y colaboradores en 2014, determinaron que dependiendo del tautómero de indazol, de la planaridad del anillo heterocíclico, de las sustituciones de cadenas laterales de diferentes longitudes y funcionalización posicional pueden conducir a una variedad de derivados de indazol y podrían ser factores que influyan en las propiedades biológicas de los compuestos [70].

Los indazoles presentan diversas propiedades biológicas, como antiinflamatorias, antibacterianas, anti-VIH, antiarrítmicas, antifúngicas, y antitumorales. En particular, cabe señalar que al menos 43 agentes terapéuticos a base de indazol han estado en el ámbito clínico; aplicación o ensayos clínicos [71, 72]. Más de dos tercios de los fármacos anticancerosos innovadores aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) entre 2016 y 2020 contienen una fracción de indazol, lo que ha dado lugar al desarrollo de medicamentos anticancerosos [68].

Algunos fármacos contra el cáncer a base de indazol como: el Niraparib que fue registrado por la FDA para el tratamiento del cáncer de trompas de Falopio, cáncer epitelial recurrente de ovario, próstata y mama, mientras que Axitinib y Pazopanib bloquean la enzima tirosina quinasa, que se utiliza en el carcinoma de células renales. En la **Figura 8** se muestran ejemplos de derivados de indazol [73].

Las propiedades biológicas de los derivados de indazol, los convierten en moléculas relevantes en la síntesis química, en la fabricación de cosméticos, polímeros y antioxidantes. Además, la modificación que se puede realizar en los anillos heterocíclicos con sustituyentes les permite cubrir un amplio espacio químico, lo que los ayuda a ser una excelente opción en el desarrollo de fármacos contra el cáncer [74, 75].

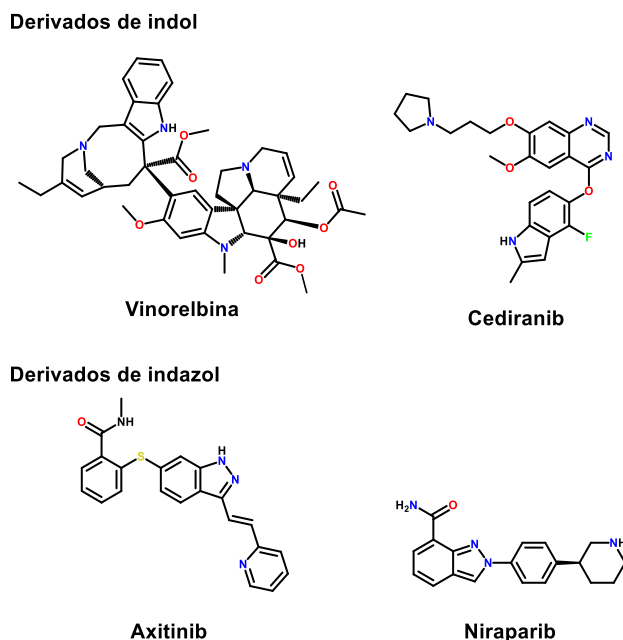


Figura 8. Ejemplos de fármacos derivados de indol e indazol aprobados por la FDA para su uso contra el cáncer.

3. ANTECEDENTES

Hallazgos históricos informan sobre el uso de plantas con fines medicinales por parte de los primeros humanos por la necesidad de aliviar las manifestaciones de las enfermedades. Ese conocimiento se transmitía de generación en generación, por lo que por años se registraron diversas plantas con propiedades medicinales y se usaban para tratar afecciones patológicas [76].

La investigación química y farmacéutica se expandió enormemente durante el siglo XX, siendo los organismos vivos una rica fuente de compuestos bioactivos. Algunas

plantas podrían usarse directamente como fármacos, sin embargo, los avances en la química sintética han permitido que los productos naturales sirvieran como guía para el desarrollo de análogos sintéticos y semisintéticos con propiedades farmacológicas mejoradas. Hoy en día, los productos naturales y sus derivados han demostrado ser útiles para estudiar vías celulares específicas tanto en células normales como tumorales [77, 78].

Varios productos naturales y sus derivados, como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina e ixabepilona, son actualmente de gran relevancia en el tratamiento contra el cáncer (**Figura 9**), además, son agentes dirigidos a los microtúbulos. Otros productos naturales como combretastatinas, epotilonas, dolastatinas y 2-metoxiestradiol se encuentran en ensayos clínicos [79].

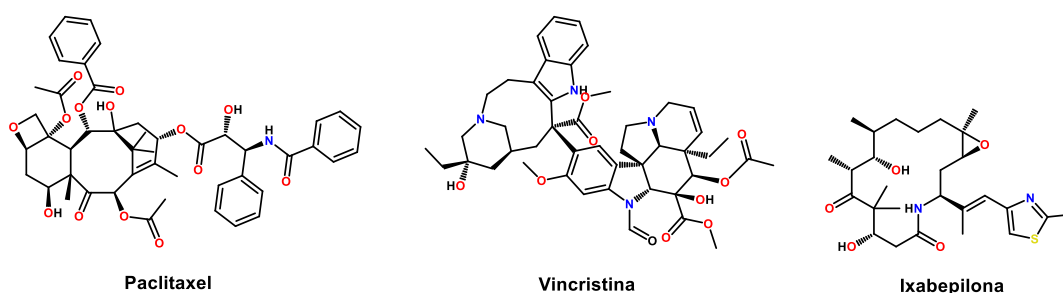


Figura 9. Productos naturales utilizados como tratamiento contra el cáncer.

Sumado a lo anterior, la hibridación molecular es una estrategia de diseño racional de fármacos que se basa en el reconocimiento de subunidades farmacofóricas en la estructura de dos o más derivados bioactivos en los que, a través de una fusión adecuada de las subunidades, dan como resultado nuevas moléculas híbridas que mantienen características previamente determinadas o nuevas entidades químicas altamente activas (**Figura 10**) [80]. Es un concepto utilizado en el diseño y desarrollo de fármacos para generar compuestos híbridos con afinidad y eficacia mejoradas, en comparación con los fármacos originales. Además, tienen la finalidad de eliminar los efectos secundarios conocidos de los fármacos individuales, así como mejorar su efecto en un objetivo específico o interactuar con múltiples objetivos como una sola molécula, reduciendo el riesgo de interacciones entre medicamentos y minimizar la resistencia a los medicamentos [81]

Por ejemplo, se puede utilizar una combinación de dos o varios fármacos directamente o conectados a través de un enlace, por lo que la conexión se puede lograr usando enlaces escindibles o no escindibles. Para usar enlaces no escindibles se basa en la capacidad de las diferentes moléculas para conservar su actividad biológica y su afinidad específica por la diana farmacológica. Por otro lado, el enfoque que utiliza un enlace escindible se basa en la liberación de dos estructuras moleculares parentales en condiciones fisiológicas o enzimáticas que se mantienen y tiene como objetivo mejorar las propiedades farmacocinéticas [82].

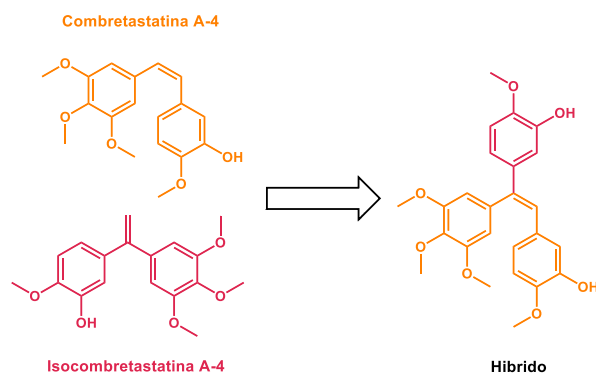


Figura 10. Ejemplo de híbridos de **CA-4** e isocombretastatina A-4.

El diseño de fármacos híbridos está en constante evolución y sigue siendo esencial para el descubrimiento de fármacos anticancerosos potentes e innovadores. Para ello, varios grupos de investigación están ideando y probando nuevas estrategias químicas y bioquímicas para su desarrollo [80].

Aprovechando el enfoque de hibridación molecular, en el grupo de investigación de “síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas” realizó la síntesis de siete derivados de **CA-4** y 2,3-difenil-2*H*-indazol, los cuales mostraron actividad citotóxica importante. Especialmente el compuesto **b** (**Figura 11**), con actividad citotóxica contra células HeLa y SK-LU-1 (CI₅₀ de 0.16 y 6.63 μM, respectivamente) y se realizaron curvas de polimerización de tubulina, lo que sugieren afinidad con la tubulina [6].

Asimismo, Flynn y colaboradores investigaron híbridos de indol, en donde se observó que los compuestos **c** y **d** (**Figura 11**) presentaban inhibición de la

polimerización de tubulina (CI_{50} de 4.1 y 1.6 μ M respectivamente), lo que indica que la presencia del átomo de nitrógeno en el sistema de indol puede ser un factor favorable para la bioactividad como agente desestabilizante de tubulina en compuestos híbridos con combretastatinas [83].

Por otro lado, Cui y colaboradores investigaron híbridos de indazol y **CA-4**, en donde se observó que los compuestos **e** y **f** (**Figura 11**) tienen actividad anti-proliferativa contra líneas celulares A-549 (adenocarcinoma de pulmón humano), HCT-116 (adenocarcinoma colorrectal humano) y HepG2 (carcinoma de hígado humano), mostrando concentración inhibitoria (CI_{50}) relevante, lo que indica que la presencia de los átomos de nitrógeno, el patrón de sustitución de los anillos (3,4,5-trimetoxifenilo) en la posición 2 y 3 del indazol y la sustitución de grupos electrodonadores en posición 5 pueden favorecer la actividad [84].

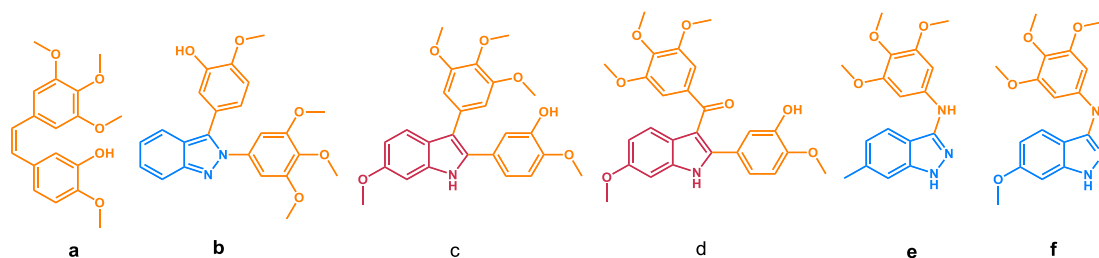


Figura 11. Moléculas híbridas derivadas de **CA-4** (a), compuesto híbrido de **CA-4** y 2,3-difenil-2*H*-indazol (b), compuestos híbridos de **CA-4** e índol (c, d), compuestos híbridos de **CA-4** e indazol (e, f). **CA-4** (naranja, derivado de indol (rojo), derivado de indazol (azul)).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de muerte, no solo en la población mexicana sino a nivel mundial. Se sabe que existen diversos tratamientos, siendo la quimioterapia una de las más prometedoras, sin embargo, se ve limitada por la resistencia a fármacos adquirida durante el tratamiento, así como los efectos adversos ocasionados por los fármacos.

Tomando en cuenta lo anterior, es de gran importancia desarrollar nuevas alternativas que ayuden en el tratamiento contra el cáncer, así como diseñar nuevas

moléculas dirigidas y específicas, que disminuyan los efectos adversos, la toxicidad y evitar la posible resistencia a fármacos en el tratamiento administrado,

Por tanto, moléculas diseñadas dirigidas a los microtúbulos, que están constituidos por tubulina α y β , además están compuestos por múltiples isoformas de tubulina, con diversas modificaciones postraduccionales conservadas. Por lo que, altera las propiedades intrínsecas de los microtúbulos, como su dinámica y mecánica y la actividad de las proteínas asociadas a los microtúbulos. En los seres humanos, los microtúbulos se componen de combinaciones mixtas de ocho isotipos de tubulina α y siete isotipos de tubulina β , que están relacionados con tejidos específicos y la expresión alterada de tubulinas β I, β II, β IVa y β V también se ha asociado con la resistencia a fármacos y resultados negativos en varios tipos de cáncer.

Por tanto, los microtúbulos han sido un enfoque relevante para los investigadores, como lo son derivados de combretastatina A-4, que favorecen la desestabilización de los microtúbulos en las células cancerosas, ocasionando citotoxicidad en diversos tipos de cáncer.

5. HIPÓTESIS

Los compuestos diseñados y evaluados *in silico* empleando acoplamiento molecular, serán sintetizados y presentarán actividad citotóxica sobre células HeLa y SK-LU-1.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Realizar la síntesis y evaluación de cinco compuestos representativos de difenilindoles y difenilindazoles, así como comparar los resultados obtenidos de los estudios de acoplamiento molecular con la evaluación de citotoxicidad en líneas celulares.

6.2 Objetivos particulares

-
-
- Determinar las posibles interacciones y el score de los ligandos con el sitio de unión en la interfaz de α/β de la tubulina con tres programas diferentes.
 - Sintetizar los compuestos propuestos por métodos de síntesis convencional.
 - Caracterizar los compuestos sintetizados mediante resonancia magnética nuclear.
 - Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de los compuestos sintetizados sobre células HeLa y SK-LU-1.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño de los derivados propuestos

En el presente trabajo se diseñaron cinco moléculas (**YPC-1–YPC-5**), derivadas de indazol con sustituyentes de grupos $-OCH_3$ en las posiciones 5 y 6. Mientras que, en las posiciones 2 y 3 se tienen anillos aromáticos disustituídos con el sustituyente $-OCH_3$ en posición *para* y el sustituyente $-OH$ en posición *meta* o trisustituídos con 3, 4 y 5 con grupos $-OCH_3$ o sin sustituyentes (**Figura 12**). El objetivo de hacer intercambio de la posición de los sustituyentes de los anillos A y B, es ver la influencia de los sustituyentes con respecto a la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas y realizar el análisis de las interacciones con el sitio de unión de la colchicina.

Por otro lado, se diseñaron derivados de indol disustituídos con grupos $-OH$ y $-OCH_3$ (**YPC-2A**) y sin sustituyentes (**YPC-1A**), con la finalidad de comparar la influencia del N en el anillo heterocíclico y de los sustituyentes de los anillos aromáticos A y B en la citotoxicidad en líneas celulares cancerosas. Adicional a lo anterior, las estructuras de las moléculas **YPC-2A** y **YPC-2** son análogos del compuesto **b**, que se muestra en la **Figura 12**, el cual dicho compuesto presenta actividad importante frente a seis líneas celulares cancerosas [105].

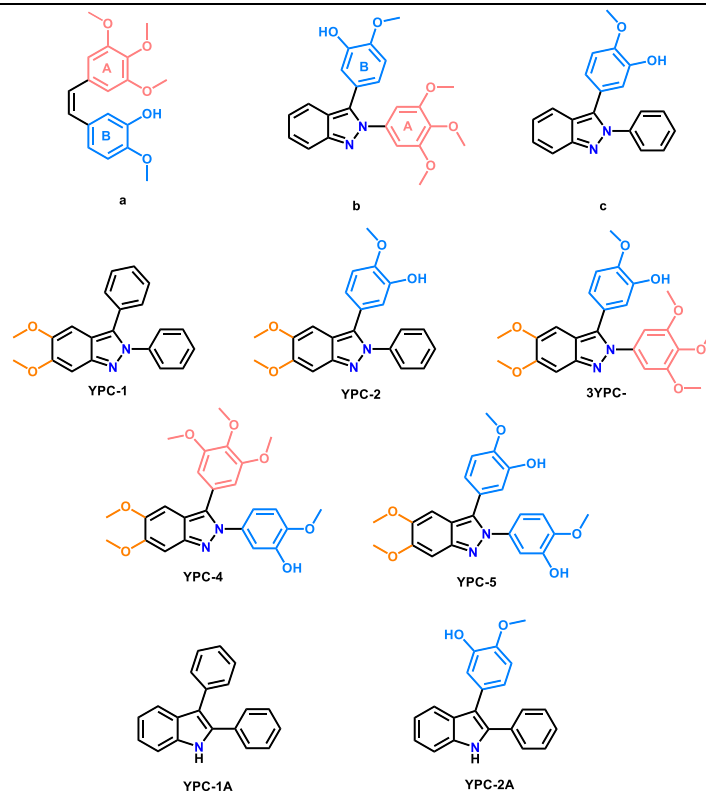


Figura 12. Estructura de la **CA-4**, compuestos híbridos **b y c** (obtenido por el grupo de trabajo) y compuestos derivados propuestos. La **CA-4** se aprecia en color rosa (anillo A) y azul (anillo B), los grupos $-OCH_3$ (color naranja) en las posiciones 5 y 6 del indazol.

7.2 Procedimiento para la predicción de propiedades fisicoquímicas

Se generaron los códigos *SMILES* de las siete moléculas propuestas (**YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**) utilizando el programa *ChemDraw Professional 16.0*. [85] se ingresaron en la plataforma *SwissADME* [86] y se calcularon los parámetros fisicoquímicos para cada molécula propuesta.

7.3 Procedimiento para análisis de acoplamiento molecular

7.3.1 Preparación de los ligandos

Los ligandos se construyeron en el programa *ChemDraw Professional 16.0* y fueron minimizados en el programa *Avogadro V1.0.1*. [87] usando el campo de fuerza universal (UFF) y agregando los H para un ambiente con $pH=7.4$, los ligandos se guardaron con una extensión **.pdb*. Posterior a esto, empleando *AutoDockTools*

1.5.6 (ADT) [88] se asignaron cargas *Gasteiger* y se definieron los enlaces rotables para cada molécula, y se guardaron con extensión **.pdbqt*. Adicionalmente, los ligandos fueron guardados con la extensión **.mol2* generados en el programa *GOLD* [89] para el acoplamiento molecular en este último programa.

7.3.2 Preparación de la proteína

La estructura cristalográfica del complejo tubulina-CA-4 (5LYJ) se recuperó de la base de datos *Protein Data Bank* [90] en formato **.pdb*, en la que se seleccionaron las cadenas A y B, se eliminaron las moléculas de disolvente, así como los cofactores y ligandos utilizando el programa *PyMOL* v2.4.1 [91]. La proteína se sometió a un proceso de minimización utilizando el servidor de *YASARA v21.8.27* [92] obteniendo un archivo con extensión **.sce*, posteriormente se limpió la proteína con el programa *UCSF Chimera* [93]. El archivo fue exportado a *AutoDockTools 1.5.6* para preparar las simulaciones de acoplamiento molecular.

Las simulaciones de acoplamiento molecular se realizaron usando una caja cúbica (*grid box*) de tamaño 50 X 50 X 50 Å con un espacio de 0.347 Å, enfocado en el sitio de unión de **CA-4** co-cristalizada en la interfaz de α/β de la tubulina (coordenadas: x=17.85, y=65.75 y z=42.59). El archivo generado se guardó con extensión **.pdbqt*.

7.3.3 Acoplamiento molecular

El estudio de acoplamiento molecular de las moléculas propuestas se realizó con tres softwares: *AutoDock 4.2*, *AutoDock Vina* [94] y *GOLD*. Se analizó la afinidad por el sitio de unión de **CA-4** co-cristalizada en la interfaz de α/β de la tubulina y se seleccionaron las conformaciones con mínima energía, menor ΔG (kcal/mol) o mayor puntaje de unión (determinado en el programa *GOLD*), y se comparó con el ligante co-cristalizado (**CA-4**).

Cada ligando con la energía libre de unión más baja se seleccionó para el análisis. Las interacciones entre ligando-receptor, así como las conformaciones se analizarán en el programa *PyMOL* v2.4.1 y los diagramas 2D de interacciones con el programa *Discovery Studio Visualizer v20.1.0*.

Se realizó el análisis de los resultados obtenidos para cada uno de los ligandos, considerando la mejor conformación con afinidad en el sitio de unión, además, las conformaciones con un ΔG de unión menor o igual respecto a la **CA-4**, para *AutoDock 4.2* y *AutoDock Vina*; en el caso de *GOLD* se determinó un valor de puntuación (*ChemPLP score* y *GOLD score*) mayor o igual que la **CA-4** y se determinó si los ligando tienen presencia de interacciones ligando-receptor de tipo hidrofóbicas y puente de hidrógeno comparado con las 17 interacciones reportadas en la literatura del complejo entre **CA-4** y en la interfaz de α/β la tubulina

7.3.3.1 Validación del estudio de acoplamiento molecular

El protocolo de acoplamiento molecular se validó mediante la comparación del RMSD (*Root-mean-square deviation of atomic positions*) entre los ligandos propuestos y la **CA-4** co-cristalizada. Para ello se utilizó el servidor a través del servidor de *Yang Zhang Lab group* [96].

7.3.3.2 Acoplamiento molecular en *AutoDock 4.2*

Las simulaciones de acoplamiento se realizaron usando una caja cúbica (grid box) de tamaño 50 X 50 X 50 Å con un espacio de 0.375 Å, enfocado en la región de unión de **CA-4** en la interfaz de α/β de la tubulina (coordenadas: x=17.85, y=65.75 y z=42.59), tomando como referencia el aminoácido Thr¹⁷⁹. Se utilizó el algoritmo genético tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 10 confórmeros, 2.5 x 10⁶ evaluaciones energéticas y 100 corridas. Se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables con afinidad por el sitio de interés y el conjunto de conformaciones más abundantes (mayor clúster). Posteriormente, se consideraron los mejores valores de energía de unión a aquellos con una menor energía de unión libre (ΔG).

7.3.3.3 Acoplamiento molecular en *AutoDock Vina*

Las simulaciones de acoplamiento se realizaron usando una caja cúbica (grid box) de tamaño 50 X 50 X 50 Å con un espacio de 0.375 Å, enfocado en la región de unión de **CA-4** en la interfaz de α/β de la tubulina (coordenadas: x=17.85, y=65.75

y $z=42.59$), tomando como referencia el aminoácido Thr¹⁷⁹. Se utilizó un valor de 500 evaluaciones como exhaustividad del cálculo y se seleccionaron solamente las conformaciones energéticamente más favorables y con afinidad por el sitio de interés. Finalmente, se tomaron en cuenta los mejores valores de energía de unión, aquellos con la menor energía de unión libre (ΔG).

7.3.3.4 Acoplamiento molecular en GOLD

Las simulaciones de acoplamiento molecular se realizaron utilizando una caja centrada en el ligando co-cristalizado con una extensión de 10 Å y 100 corridas para cada molécula. Además, se utilizaron las funciones de puntuación *ChemPLP score* (*Piecewise Linear Potential*) y *Gold Score* [95].

7.4 Síntesis de los compuestos

Los reactivos utilizados para la síntesis de los compuestos fueron de la marca Sigma-Aldrich y Merck grado reactivo, así como disolventes grado analítico de las marcas Sigma-Aldrich y J. T. Baker.

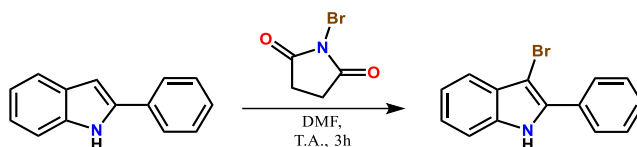
El avance de las reacciones se monitoreo a través de cromatografía en capa fina (CCF) en placas de vidrio recubiertas con silica-gel de 3 x 5 cm 60 F254 (Merck). Para la elución de las placas cromatográficas se utilizaron los sistemas de elución descritos en cada procedimiento. La visualización del avance de reacción y de los compuestos obtenidos se llevó a cabo con una lámpara de luz ultravioleta. Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en equipo Fisher-Johns.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN ¹H) y carbono 13 (RMN ¹³C) se determinaron en un espectrómetro Marca Varian de 600 MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, y CDCl₃ como disolventes.

7.4.1 Procedimiento para la obtención del 3-bromo-1*H*-indol

En un matraz de fondo redondo de 25 mL se disolvió el 2-fenilindol (1 mmol) con 5 mL de DMF. Posteriormente, se agregó gota a gota una solución de NBS (1 mmol) disueltos en 3 mL de DMF a la solución de 2-fenilindol y se dejó en agitación por 3

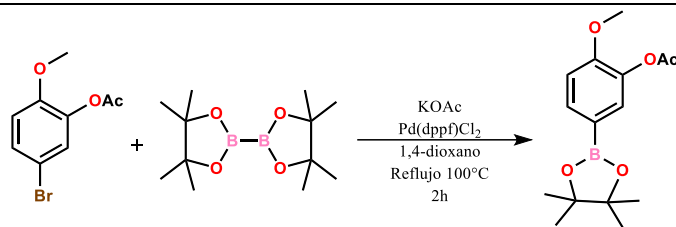
h en atmosfera de N₂ a temperatura ambiente (**Esquema 1**). La reacción se monitoreó empleando CCF con Hexano/AcOEt (80:20) como eluyente. Se obtuvo una solución de color amarillo, que se vertió en una cama de hielo con agitación vigorosa hasta formar un precipitado color amarillo claro. Rendimiento: 94 %, p.f. 106–108 °C. ¹H NMR (600 MHz, cdcl₃) δ 8.01 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (t, *J* = 7.2, 7.8 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 7.30 – 7.17 (m, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, cdcl₃) δ 162.50, 135.28, 134.21, 131.35, 128.78, 128.35, 127.72, 123.44, 120.86, 119.48, 111.05, 89.99.



Esquema 1. Ruta de síntesis para la obtención del 3-bromo-1*H*-indol.

7.4.2 Procedimiento para la síntesis del éster borónico

Para su síntesis se realiza a través de una borilación de Miyaura [98], **Esquema 2**. En un matraz de fondo redondo de 25 mL se colocaron el acetato de 5-bromo-2-metoxifenilo (1 mmol) y el bis(picolinato)diborano (1.2 mmol) con 8 mL de 1,4-dioxano para disolver el sólido. Posteriormente, se agregó acetato de potasio (5 mmol), 5% de Pd(dppf)Cl₂ y se llevó 100 °C en atmosfera de nitrógeno y con agitación constante por 2 h. La reacción se monitoreó empleando CCF con Hexano/AcOEt (80:20) como eluyente. Una vez agotada la materia prima, se eliminó el disolvente a presión reducida en un rotaevaporador. El producto de reacción se filtró utilizando celita y usando como disolvente MeOH, el líquido obtenido se eliminó en el rotaevaporador, para dar un sólido color café oscuro. Asimismo, la purificación del producto fue a través de cromatografía en columna abierta de gel de sílice usando como eluyente Hexano/AcOEt (80:20). Se obtuvo un sólido cristalino de color blanco con un punto de fusión de 107–108 °C y un rendimiento de 52 %.

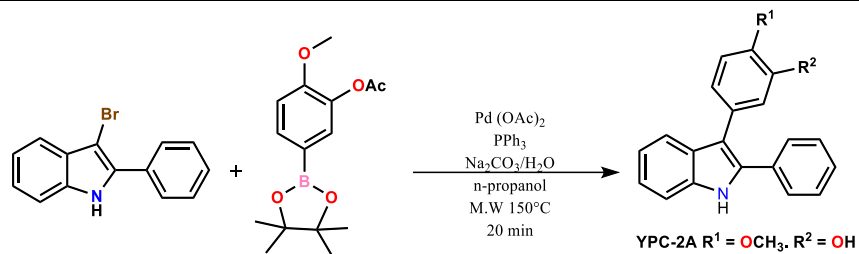


Esquema 2. Obtención del acetato de 2-metoxi-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenilo por borilación de Miyaura.

7.4.3 Procedimiento general para la obtención del compuesto derivado de indol YPC-2A

La síntesis del compuesto **YPC-2A** se llevó a cabo empleando la reacción de Suzuki-Miyaura [99], **Esquema 3**.

En un vial de microondas de 10 mL, se colocó el 3-bromo-2-fenilindol (1 mmol), el ácido fenil borónico o el boronato apropiadamente sustituido (sección 7.4.2) (1.1 mmol), Pd(AcO)₂ (0.01 mmol), trifenilfosfina (PPh₃, 0.03 mmol), carbonato de sodio (1.2 mmol) disuelto en 1 mL de agua y 5 mL de n-propanol. Posteriormente, se colocó en el equipo de reacción por microondas, a una temperatura de 150°C por 20 min. Se realizó una CCF utilizando Hexano/AcOEt (80:20) para comprobar el consumo total de la materia prima. Se realizó una extracción con AcOEt 15 mL (x3) y las fases orgánicas juntas se lavaron con 15 mL de salmuera, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente al vacío con rotaevaporador. El producto se purificó por cromatografía en columna abierta de gel de sílice empleando Hexano/AcOEt (90:10) como eluyente. Se obtuvo un sólido recristalizado con MeOH, se obtuvieron cristales amarillos. Rendimiento: 33 %, p.f. 168–170 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ ppm): 8.21 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.8, 8.4 Hz 3H), 7.33 (t, *J* = 7.2, 7.8 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.23 (td, *J* = 7.2, 0.6 Hz, 1H), 7.14 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 1.8, 7.8 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 3.93 (s, 3H). RMN ¹³C (151 MHz CDCl₃, δ ppm): 145.49, 145.21, 145.18, 135.74, 133.78, 132.72, 128.89, 128.64, 128.33, 128.28, 128.05, 127.58, 126.71, 122.59, 121.94, 120.28, 119.75, 116.27, 110.77, 55.90.

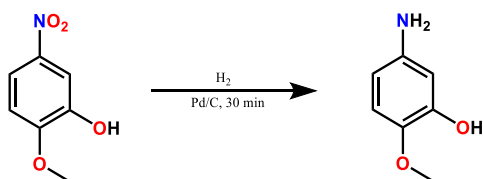


Esquema 3. Síntesis de 2,3-difenilindol por acoplamiento de Suzuki-Miyaura.

7.4.3, Procedimiento para la obtención del 2-hidroxi-3-metoxianilina

Se realizó a través de una reducción del grupo nitro del 2-metoxi-5-nitrofenol por una reducción catalítica con un hidrogenador y utilizando paladio como catalizador.

Para ello, se colocó el 2-metoxi-5-nitrofenol (1 mmol) en una botella de reacción, se adicionó 10 % de Pd/C, se homogenizaron los sólidos y se agregó lentamente 50 mL de MeOH. Se colocó la botella de reacción en el aparato de agitación para hidrogenación, envolviendo la botella con una chaqueta de protección. Se inició la reacción inyectando 62 lb de H_2 , se dejó reaccionar por 30 min en agitación vigorosa. Se realizó una CCF utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85:15) para monitorear el término de la reacción. El producto se filtró en una cama de celita, lavándola con MeOH. Se eliminó el disolvente a presión reducida con un rotaevaporador. Se obtuvo un sólido naranja, con un rendimiento de 76 %.



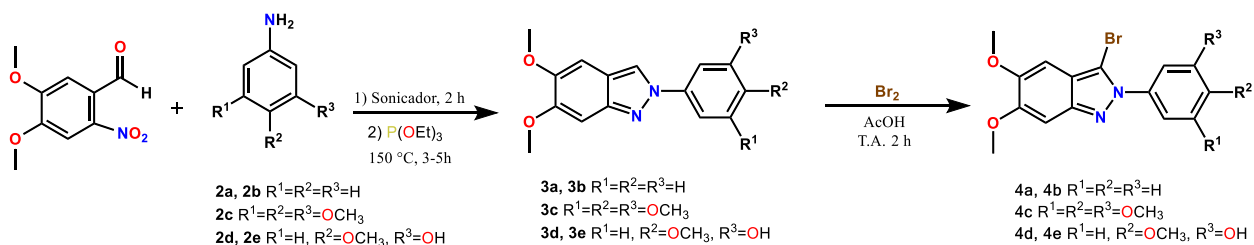
Esquema 4. Reducción de 2-metoxi-5-nitro fenol por hidrogenación catalítica.

7.4.4 Procedimiento para la obtención de los precursores derivados de indazol

Se realizó la síntesis de cinco moléculas (YPC-1–YPC-5), para ello se siguió la metodología de la **Esquema 5** [6].

En un tubo de 10 mL, se colocaron el 6-nitroveratraldehído (1 mmol) y la anilina correspondiente (1 mmol). La mezcla se sometió a ultrasonicación por 2 h para dar la imina correspondiente. Posteriormente, se transfirió la imina sintetizada en un matraz bola, se agregaron 3 equivalentes de P(OEt)₃ y se calentó a 150 °C por 5 h con agitación constante. El exceso P(OEt)₃ se eliminó con un equipo de destilación Kugelrohr a presión reducida hasta obtener un sólido color café oscuro, que posteriormente se purificó empleando cromatografía en columna.

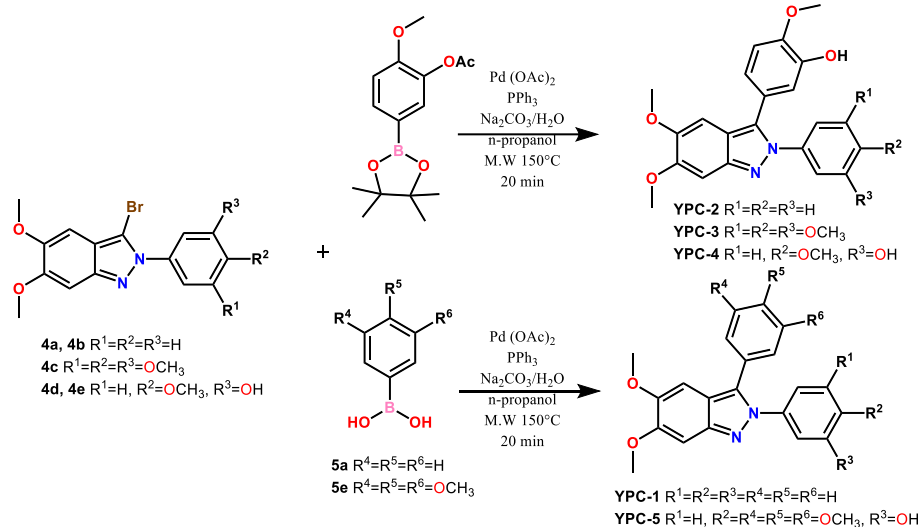
Para la obtención del compuesto 3-bromo-1*H*-indazol correspondiente, se realizó a través de una bromación en la posición 3 con 0.5 equivalentes de una solución de Br₂/AcOH 1M, que se agregó gota a gota y se dejó en agitación por 1 h. La reacción se vertió en una cama de hielo con agitación vigorosa hasta formar un precipitado que se filtró y se recuperó en un vial.



Esquema 5. Metodología general para la formación de 3-bromo-1*H*-indazol correspondiente.

7.4.5 Procedimiento para la obtención de los compuestos derivados de indazol: YPC-1 a YPC-5

La síntesis de los compuestos **YPC-1** a **YPC-5** se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Suzuki-Miyaura [99], como se describe en el apartado 7.4.3 (**Esquema 3**).



Esquema 6. Acoplamiento de Suzuki-Miyaura para la obtención de los compuestos **YPC-1** a **YPC-5**.

5,6-dimetoxi-2,3-difenil-2*H*-indazol (YPC-1). Siguiendo el procedimiento 7.4.6 se obtuvieron cristales naranjas claro, recristalizados de MeOH/CH₂Cl₂. Rendimiento: 34 %, p.f. 198-199 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.44 – 7.29 (m, 10H), 7.07 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.91 (s, 3H).

5-(5,6-dimetoxi-2-fenil-2*H*-indazol-3-il)-2-metoxifenol (YPC-2). Siguiendo el procedimiento 7.4.6 se obtuvieron cristales naranjas oscuro, recristalizados de MeOH/CH₂Cl₂. Rendimiento: 29 %, p.f. 108-110 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.90 (s, 3H).

5-(5,6-dimetoxi-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2*H*-indazol-3-il)-2-metoxifenol (YPC-3). Siguiendo el procedimiento 7.4.6 se obtuvo un sólido naranja oscuro. Rendimiento: 25 %, p.f. 70-75 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.04 (s, 1H), 7.02 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.63 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.71 (s, 6H).

5-(5,6-dimetoxi-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2*H*-indazol-2-il)-2-metoxifenol (YPC-4). Siguiendo el procedimiento 7.4.6 se obtuvo un sólido amarillo oscuro. Rendimiento:

34 %, p.f. 179-182 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6.99 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.77 (dd, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.49 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.78 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H).

5,5'-(5,6-dimetoxi-2*H*-indazol-2,3-diil)bis(2-metoxifenol) (YPC-5). Siguiendo el procedimiento 7.4.3 se obtuvieron cristales amarillos oscuro, recristalizados de MeOH. Rendimiento: 36%, p.f. 142-144 °C. RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.01 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.80 – 6.77 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.91 – 3.89 (m, 11H).

7.5 Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares

Se realizó la evaluación de citotoxicidad en líneas celulares de los compuestos **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5** en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, bajo la tutoría del Dr. Félix Ernestino Matadamas Martínez.

Para preparar las soluciones stock de los compuestos se solubilizaron en DMSO para obtener una concentración de 10 mM para preparar las diluciones seriadas 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 y 0.781 μM. Como control positivo se empleó la **CA-4** a 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0062, 0.0031, 0.0015, 0.00078 μM y como control negativo las células sin ningún tratamiento. Para el ensayo de citotoxicidad se emplearon líneas celulares humanas ATCC de adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1) y de cáncer cervicouterino (HeLa).

Para la captura de imágenes se usó el microscopio invertido CARL ZEISS Axiovert-25. Por otra parte, se utilizó un lector de placas de 96 pozos BIOTEK Elx800 para determinar la actividad citotóxica con sulforodamina B.

7.5.1 Mantenimiento de líneas celulares

Las líneas celulares se mantienen en un medio de cultivo DMEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco), suplementado con 5 % de suero fetal bovino (FBS), una mezcla de antibiótico al 1 % y bicarbonato de sodio (2.2 g/L), en cajas de cultivo

estériles e incubadas en condiciones estándar (5 % de CO₂, a 37 °C y 100 % de humedad relativa).

7.5.2 Conteo celular

Los cultivos se trataron con una solución de tripsina (0.05 %) durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, se tomó una alícuota de la suspensión obtenida por tripsinización y se contaron las células en una cámara de Neubauer.

7.5.3 Aplicación del tratamiento

Se colocaron 100 µL de una solución de medio DMEM con un homogenizado de 3000 células en cada pozo de la placa de 96 pozos y se agregaron 100 µL de la dilución correspondiente para cada compuesto a una concentración 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 y 0.781 µM. Como control positivo se empleó la **CA-4** a 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0062, 0.0031, 0.0015, 0.00078 µM y como control negativo las células sin ningún tratamiento. Para el ensayo de citotoxicidad se emplearon líneas SK-LU-1 y HeLa. Se dejaron las placas en incubación en condiciones estándar (5 % CO₂, a 37 °C y 100 % de humedad relativa) por 48 h.

7.5.4 Análisis morfológico de células

Una vez aplicado el tratamiento a las células y pasadas las 48 h de incubación, se realizó la visualización de la morfología de las células y se capturaron fotografías con un microscopio invertido para realizar un estudio de cambios morfológicos inducidos por el efecto de los compuestos probados y compararlos con el control de células sin tratamiento. Para la visualización y captura de imágenes se usó el microscopio invertido CARL ZEISS Axiovert-25.

7.5.5 Ensayo de citotoxicidad con sulforodamina B

Se adicionó a cada pozo 50 µL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 50 %, posteriormente se deja incubando por 2 h a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se retira el TCA y cada placa se lava 5 veces con agua desionizada, y se dejan secando. Una vez que las placas están totalmente secas, se adiciona a cada pozo 100 µL de una solución de sulforodamina B al 0.08 % y se incuba por 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se elimina el colorante y se lavan los

pozos con 100 μ L de ácido acético al 1 % por 5 veces. Finalmente, se adicionan 100 μ L de una solución de TRIS-base 10 mM (pH= 10.5), se agitan y se mide la densidad óptica en un lector de placas a una longitud de onda de 490 nm. Por otra parte, se utilizó un lector de placas de 96 pozos BIOTEK Elx800 para determinar la actividad citotóxica con sulforodamina B.

7.5.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos de absorbancias se usaron para calcular el porcentaje de inhibición a 50 μ M comparada con el control sin tratamiento para todos los compuestos. Posteriormente, se calculó la CI_{50} para los compuestos **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-2A**, y del control positivo (**CA-4**).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se revisarán los resultados obtenidos para los derivados de difenilindoles y difenilindazoles diseñados. Se dividirá en cuatro secciones principales, la determinación de las propiedades fisicoquímicas, acoplamiento molecular en *AutoDock 4.2*, *AutoDock Vina* y *GOLD* con su respectiva validación, la ruta de síntesis y su caracterización por métodos espectroscópicos y las pruebas biológicas en líneas celulares humanas cancerosas (SK-LU-1 y HeLa) con un análisis SAR (relación estructura-actividad).

Como se mencionó en la metodología del apartado 7.1, se diseñaron difenilindoles y difenilindazoles derivadas de **CA-4**, para ello se consideró el trabajo previo de nuestro grupo de investigación, donde se diseñaron compuestos derivados de indazol, obteniéndose un compuesto (**Figura 3 (b)**) con importante actividad citotóxica frente a la línea celular HeLa ($CI_{50} = 0.16 \mu\text{M} \pm 0.01$) y SK-LU-1 ($CI_{50} = 6.63 \mu\text{M} \pm 0.52$). Con lo anterior, se tomó este hallazgo para diseñar y proponer derivados de indazol y además diseñar indoles, con la finalidad de determinar la importancia del nitrógeno en el anillo heterocíclico.

8.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

A través del servidor *SWISSADME* se determinaron las propiedades fisicoquímicas de las siete moléculas propuestas. Para ello, las estructuras en 2D y códigos

SMILES de los compuestos **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5** se generaron con el programa *ChemDraw Professional 16.0*. Los descriptores moleculares calculados están relacionados con una predicción de la biodisponibilidad oral y perfil ADMET de estos compuestos **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**. De manera particular se determinó el peso molecular (PM), donadores de puente hidrógeno (HD), aceptores de puente hidrógeno (HA), enlaces rotables (ER), área polar superficial (tPSA) y coeficiente de partición (LogP). Los datos obtenidos se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas a través del servidor *SWISSADME*

Serie	Molécula	PM (g/mol)	Log P	Enlaces rotables	HD	HA	TPSA (A ²)
1	YPC-1	330.38	3.53	4	0	3	36.28
	YPC-2	376.41	3.63	5	1	5	65.74
	YPC-3	466.48	4.13	8	1	8	93.43
	YPC-4	466.48	4.31	8	1	8	93.43
	YPC-5	422.43	3.93	6	2	7	95.2
2	YPC-1A	269.34	5.34	2	1	0	15.79
	YPC-2A	315.37	4.95	3	2	2	45.25

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los compuestos son de importancia, ya que nos aportan información para predecir si una molécula es candidato líder, en el desarrollo y descubrimiento de moléculas bioactivas. Con lo anterior, se seleccionaron descriptores que están relacionados con las reglas de Lipinski y Veber, debido a que dentro de la química farmacéutica se usan como guía para encontrar y diseñar moléculas con buena biodisponibilidad oral y perfil ADMET [100, 101].

Con lo anterior, se tiene que considerar que las reglas de Lipinski [100] sugieren un $PM \leq 500$, $HBD \leq 5$, $HBA \leq 10$ y $LogP \leq 5$; mientras que las reglas de Veber [101] indican que se debe tener $ER \leq 10$ y $tPSA \leq 140$ para poder predecir si los compuestos obtenidos tendrán buena biodisponibilidad oral. Sin embargo, en la **Tabla 1** se aprecia que el compuesto **YPC-1A** no cumple con la regla de Lipinski $LogP \leq 5$, ya que presenta un valor de $Log P = 5.34$, lo que puede indicar que esta molécula puede tener problemas para disolverse en agua, ya que tiene un valor alto

de Log P, indicando que podría preferir entornos hidrofóbicos como la bicapa lipídica de las células. Además, podría presentar problemas de biodisponibilidad oral en estudios preclínicos, de acuerdo con lo descrito por Lipinski [100, 101].

Por otro lado, los compuestos **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**. cumplen con las reglas de Lipinski y Veber, lo cual indica que los compuestos propuestos presentaran buena biodisponibilidad oral. Asimismo, es importante mencionar que estas predicciones no deben tomarse como absolutas, solo sugieren que los compuestos son buenos candidatos a fármacos, y sustentar esto con estudios *in vitro* o *in vivo*.

8.2 Acoplamiento molecular en *AutoDock 4.2*, *AutoDock Vina* y *GOLD*

Para evaluar las moléculas propuestas derivados de **CA-4** como posibles inhibidores de la polimerización de la tubulina, se realizó un estudio de acoplamiento molecular sobre el sitio de unión de la colchicina ubicado en la interfaz de la α/β de la tubulina.

Para realizar dicho estudio, se utilizaron tres programas diferentes, *AutoDock 4.2*, *AutoDock Vina* y *GOLD*, para comparar los resultados obtenidos y analizar las correspondientes interacciones de los compuestos con el sitio de unión. Es importante mencionar, que los programas utilizados tienen como algoritmo de búsqueda un algoritmo genético (GA) y se basan en un método de puntaje de unión semi-empírico y, además, tienen una diferencia en la velocidad de cálculo [102].

Por otro lado, se utilizó la **CA-4** para comparar los resultados calculados para los siete compuestos (**YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**), ya que es el ligante que se encuentra co-cristalizado en la proteína usada para realizar el acoplamiento molecular. Además, que como ya se describió en el apartado de Antecedentes (Sección 3.5), la **CA-4** es un agente despolimerizante de la tubulina, que se une en el sitio de unión de la colchicina en la interfaz de la α/β de la tubulina [89, 94]. Por tanto, se realizó una comparación del puntaje de unión obtenido para cada compuesto, así como de las interacciones ligando-receptor con respecto a lo obtenido para la **CA-4**, con la finalidad de encontrar las mejores moléculas que se unen al sitio de interés.

8.2.1 Validación del acoplamiento molecular

Complementario a lo anterior, el protocolo de acoplamiento molecular se validó para los tres programas utilizados mediante la comparación del RMSD (*Root-mean-square deviation of atomic positions*) entre los ligandos propuestos y la **CA-4** con respecto al ligando co-cristalizado, a través del servidor de *Zhanggroup* (**Tabla 2**). En los que se obtuvieron valores menores a 2, lo que significa que el método de acoplamiento molecular podría reproducir de forma confiable la forma en que se unen los ligandos al sitio de unión.

Tabla 2. Valores de RMSD obtenidos para la validación del acoplamiento molecular

	<i>Autodock 4.2</i>	<i>AutoDock Vina</i>	<i>ChemPLP Score</i>	<i>GOLD Score</i>
Valor de RMSD para CA-4	0.837	0.660	0.931	0.931

8.2.2 Energía de unión ligando-receptor para YPC-1A, YPC-2A, YPC-1–YPC-5 y CA-4

La **Tabla 3** resume los resultados de los puntajes de unión o energías de unión ligando-receptor en el acoplamiento molecular para los compuestos **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5** y **CA-4**, este último como referencia. Como ya se mencionó anteriormente, se usaron *AutoDock 4.2* y *AutoDock Vina* en los que se determinan valores de energía de unión ligando-receptor, para ello se calcula el ΔG (kcal/mol), el cual mientras menor sea el valor mayor es la afinidad de la molécula propuesta con el sitio de unión.

Adicional a esto, se utilizó el programa *GOLD* que tiene la característica de que se puede calcular diferentes valores de puntajes de unión adimensionales. Sin embargo, la escala de puntuación es diferente para cada una, *ChemPLP* y *GoldScore*, en la que ambos casos nos dan una guía sobre la pose del ligando y la afinidad con el receptor; mientras mayor sea el puntaje mayor será la afinidad ligando-receptor.

La función de aptitud de *ChemPLP score* incorpora un término, ΔG , que representa el cambio total de energía libre, incorpora un término de choque de átomos de proteína-ligando y un término de energía interna. Además, toma en cuenta, el área de contacto hidrofóbico-hidrófobo, enlaces de hidrógeno, flexibilidad del ligando y la interacción con metales. Por otro lado, *Gold score* es la función de puntuación que se ha optimizado para la predicción de las posiciones de unión de ligandos, tomando en cuenta la energía de enlace de hidrógeno, la energía de Van der Waals, la interacción de los metales y la tensión de torsión del ligando [89].

Tomando en cuenta todo lo anterior, podemos observar en la **Tabla 3**, que los difenilindazoles presentaron mejor energía de unión para el programa *AutoDock 4.2* con un valor de -10.85 kcal/mol para la molécula **YPC-3**, mientras que la mejor energía de unión para los difenilindoles fue de -9.60 kcal/mol para **YPC-2A**. Por lo que, ambos valores son menores que la **CA-4** que se usó como referencia con un valor de energía de unión de -7.56 kcal/mol, lo que significa que los difenilindoles y los difenilindazoles tienen mejor energía de unión con el sitio de unión de la colchicina.

Para el caso de *AutoDock Vina* se puede observar que se calculó la mejor energía de unión ΔG , para el derivado de indol **YPC-1A** con un valor de -9.2 kcal/mol, mientras que el mejor compuesto de los derivados de indazol es para el compuesto **YPC-1** con una energía de unión de -9.0 kcal/mol. Adicional a eso, se puede apreciar que se obtuvieron mejores resultados para los compuestos propuestos con respecto a la referencia **CA-4**, con un valor de -8.4 kcal/mol.

En el caso de *GOLD*, como ya se mencionó, se utilizaron dos funciones de puntuación, *ChemPLP score* y *GOLD score*, para poder comparar los resultados obtenidos. Para *ChemPLP score* se calculó el mejor puntaje o score para la molécula **YPC-2A** con un valor de 68.1298, siendo mayor que la referencia **CA-4** con un score de 61.7348; sin embargo, ninguna molécula presentó mejor puntaje con respecto a la referencia. Asimismo, en *GOLD score* la molécula derivada de indol **YPC-2A** obtuvo un mayor puntaje de unión (57.3486) y la molécula **YPC-1A**

(55.8356) que la referencia **CA-4** (51.7167). Pero, en el caso de los indazoles no se obtuvieron valores de puntaje de unión mayores que la referencia (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resultados obtenidos en el acoplamiento molecular para los compuestos diseñados y **CA-4**

Serie	Compuesto	ΔG (kcal/mol) <i>AutoDock</i> 4.2	ΔG (kcal/mol) <i>AutoDock</i> <i>Vina</i>	<i>ChemPLP</i> score	<i>Gold</i> score
1	YPC-1	-9.73	-9.0	58.8768	38.8159
	YPC-2	-10.30	-8.3	58.7735	37.4542
	YPC-3	-10.85	-7.0	27.3902	11.2040
	YPC-4	-8.44	-2.5	0.9726	-6.9262
	YPC-5	-10.83	-7.8	51.1072	39.8342
2	YPC-1A	-9.33	-9.2	65.5731	55.8356
	YPC-2A	-9.60	-8.4	68.1298	57.3486
Referencia	CA-4	-7.56	-8.4	73.8310	51.7167

8.2.3 Afinidad sobre el sitio de unión de la colchicina para YPC-1A, YPC-2A, YPC-1–YPC-5 y CA-4

En *AutoDock 4.2*, los indoles **YPC-1A** y **YPC-2A** presentan un modo de unión en el sitio similar a la **CA-4**. Para el caso de **YPC-2A**, se observa que la posición del anillo trisustituido (TMP) de la **CA-4** y el anillo disustituido (grupo $-OCH_3$ en posición *para* y $-OH$ es posición *meta*) de **YPC-2A** se orientan de manera similar, mientras que el anillo de indol toma la posición del anillo disustituido de la **CA-4**, como podemos observar en la **Figura 13 (A)**. Por otro lado, **YPC-1A** toma una conformación tal que, los anillos de fenilo se encuentran orientados hacia los anillos disustituido y TMP de la **CA-4**.

Por otro lado, en *AutoDock Vina*, el análisis de los modos de unión en el sitio para las moléculas de indol **YPC-1A** y **YPC-2A** reveló que el anillo no sustituido de la posición 2, para ambas moléculas, se encuentra orientado hacia la posición del anillo trisustituido de la **CA-4**. Además, el anillo de indol se orienta hacia la posición del anillo disustituido de **CA-4** como se observa en la **Figura 13 (B)**.

En el programa *GOLD*, se realizó un análisis para los modos y poses de unión obtenidos por la función de puntuación *ChemPLP score*. Se determinó que el modo de unión en el sitio para el indol **YPC-2A** toma una pose en la que el anillo disustituido se encuentra orientado en la posición del anillo trimetoxilado de la **CA-4** y el anillo no sustituido del indol se localiza en la posición del anillo disustituido de la **CA-4**, **Figura 13 (C)**. Por el contrario, el compuesto **YPC-1A** se observa un desplazamiento del heterociclo indol hacia la posición del anillo trimetoxilado de la **CA-4**.

De igual manera, para el programa *GOLD* (*GOLD score*) se observaron poses similares, con lo descrito anteriormente en *ChemPLP score*, para las moléculas **YPC-1A** y **YPC-2A** con respecto a la conformación de la **CA-4**, como se ve en la **Figura 13 (D)**.

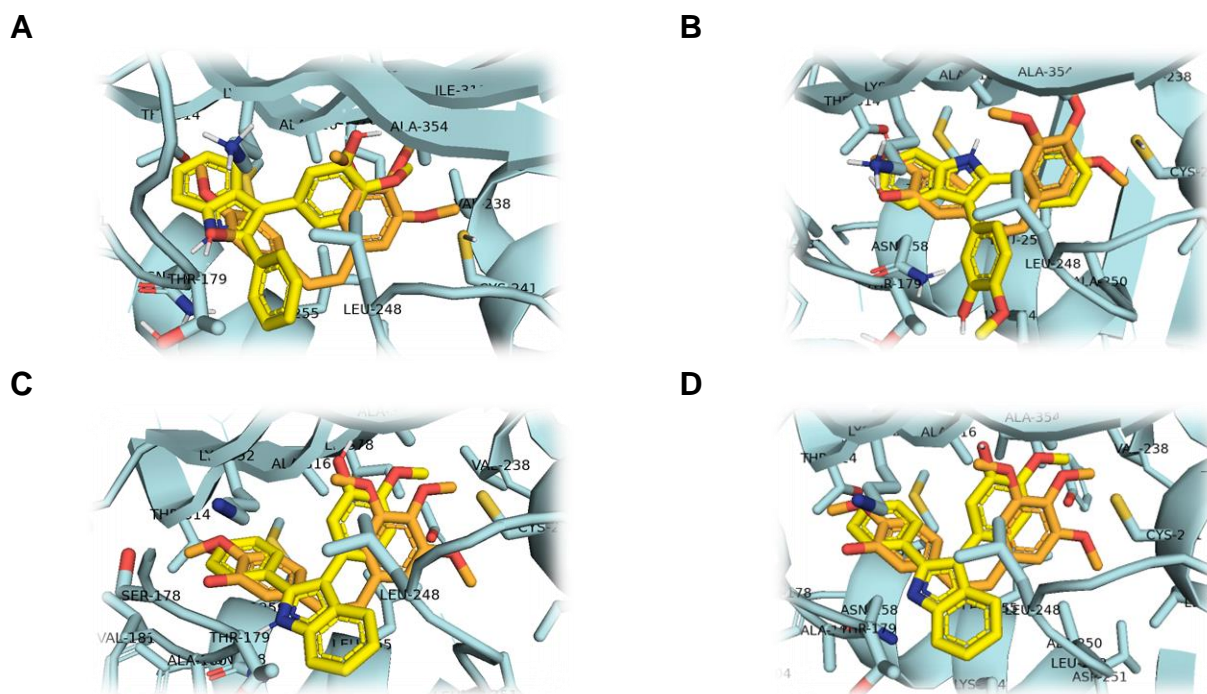


Figura 13. Mejores poses de unión para la molécula derivada de indol: **YPC-2A** (amarillo), y la **CA-4** (naranja) con *AutoDock 4.2* (A), *AutoDock Vina* (B), *ChemPLP score* (C) y *GOLD score* (D).

En *AutoDock 4.2*, los derivados de indazoles **YPC-1-YPC-3** y **YPC-5** presentan un modo de unión en el sitio similar a la **CA-4**. Se observa que la posición del anillo

disustituido (grupo $-OCH_3$ en posición *para* y $-OH$ es posición *meta*) de la **CA-4** y grupos $-OCH_3$ que están en posiciones 5 y 6 de los indazoles **YPC-1–YPC-3** y **YPC-5** se orientan de manera similar. Sin embargo, el anillo en posición 2 (sin sustituyentes, disustituido o trisustituido) de los indazoles toma una posición similar al anillo TMP de la **CA-4** pero no en su totalidad, **Figura 14 (A)**. Por otro lado, **YPC-4** tiene una pose de unión en la que el anillo trisustituido toma la posición del anillo disustituido de **CA-4**, mientras que el anillo disustituido de **YPC-4** se orienta como el anillo TMP de la **CA-4**.

Por otro lado, en *AutoDock Vina*, el análisis de los modos de unión en el sitio para las moléculas de indazoles **YPC-1–YPC-5**. Se observa que la posición del anillo disustituido de la **CA-4** y los grupos $-OCH_3$ que están en posiciones 5 y 6 de los indazoles **YPC-1–YPC-3** y **YPC-5** se orientan de manera similar. Además, el anillo en posición 2 (sin sustituyentes, disustituido o trisustituido) de los indazoles **YPC-1–YPC-3** y **YPC-5** toma una posición similar al anillo TMP de la **CA-4**, sin embargo, no en su totalidad, **Figura 14 (B)**. Lo que podemos observar para la molécula **YPC-4**, tiene una conformación en la que el anillo trisustituido toma la posición del anillo disustituido de **CA-4**, mientras que el anillo disustituido de **YPC-4** se orienta como el anillo TMP de la **CA-4**.

En el programa *GOLD*, se realizó un análisis para los modos y poses de unión obtenidos por la función de puntuación *ChemPLP score*. Se observa que la posición del anillo disustituido de la **CA-4** y los grupos $-OCH_3$ que están en posiciones 5 y 6 de los indazoles **YPC-1** y **YPC-3** se orientan de manera similar, además, el anillo en posición 2 (sin sustituyentes, o trisustituido) de los indazoles posee una posición similar al anillo TMP de la **CA-4**, como se observa en la **Figura 14 (C)**. Por otro lado, la posición del anillo TMP de la **CA-4** y los grupos $-OCH_3$ que están en posiciones 5 y 6 de los indazoles **YPC-2** y **YPC-5** se orientan de manera similar, además, el anillo en posición 2 (sin sustituyentes, o disustituido) de los indazoles adquiere una posición similar al anillo disustituido de la **CA-4**. En el caso de **YPC-4**, tiene una conformación en la que el anillo trisustituido toma la posición del anillo TMP de **CA-4**.

Asimismo, para el programa *GOLD* (*GOLD score*) se observaron poses similares para los indazoles **YPC-1–YPC-5**, por lo que se puede describir que, la posición del anillo disustituido de la **CA-4** y los grupos $-OCH_3$ que están en posiciones 5 y 6 de los indazoles **YPC-1–YPC-5** se orientan de manera similar, además, el anillo en posición 2 (sin sustituyentes, disustituido o trisustituido) de los indazoles posee una posición similar al anillo TMP de la **CA-4**. Con la diferencia de que el anillo en la posición 3 de cada indazol tienen una orientación diferente fuera del plano, dando como resultado interacciones diferentes en esa posición, **Figura 14 (D)**.

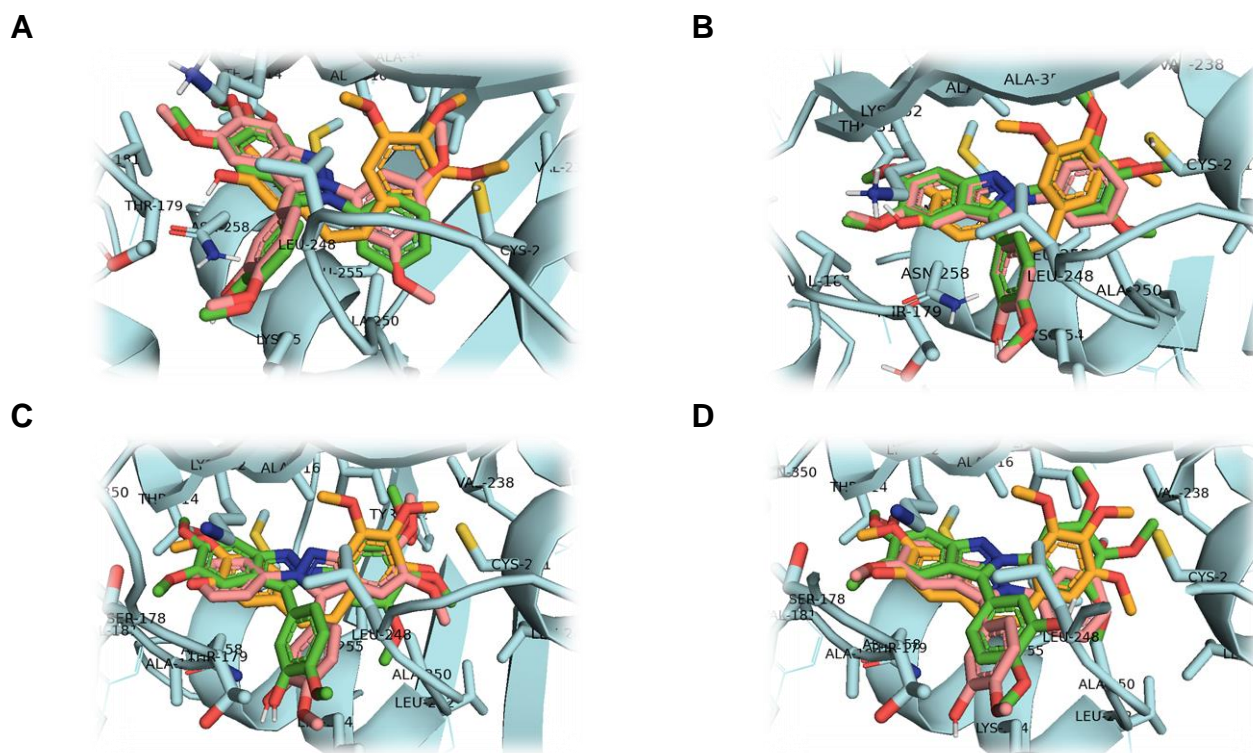


Figura 14. Mejores poses de unión para la molécula derivada de indazol: **YPC-2** (rosa), **YPC-3** (verde) y **CA-4** (naranja) con *AutoDock 4.2* (A), *AutoDock Vina* (B), *ChemPLP score* (C) y *GOLD score* (D).

Adicional a lo anterior, se realizó una comparación de las mejores poses de unión obtenidas de los programas *AutoDock Vina*, *AutoDock 4.2* y *GOLD* (*ChemPLP score*) de las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5** a través del cálculo del *RMSD*. Se comparó *AutoDock Vina* vs *AutoDock 4.2*, *AutoDock Vina* vs *GOLD* (*ChemPLP score*) y *AutoDock 4.2* vs *GOLD* (*ChemPLP score*) como se muestra en la **Tabla 4**.

De manera general, podemos observar que tanto el programa *AutoDock Vina* y *AutoDock 4.2* obtuvieron poses de unión muy similares para las moléculas derivadas de indazol. Pero en el caso de los derivados de indol, se obtuvieron valores de *RMSD* por arriba de 5, lo que indica que las poses de unión obtenidas en ambos programas son muy diferentes entre sí por la posición de los átomos de las moléculas en el sitio de unión.

Además, al comparar las poses de unión de *AutoDock Vina* con *GOLD (ChemPLP score)* se puede observar que las poses para las moléculas **YPC-1** y **YPC-3** son muy similares entre sí, ya que se observa un *RMSD* por debajo de 1. Sin embargo, en las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2**, **YPC-2A**, **YPC-4** y **YPC-5** se obtuvieron valores de *RMSD* por arriba de 5, indicando que hay diferencia entre las poses de unión obtenidas.

De igual manera, se puede observar que al comparar las poses de unión de los programas *AutoDock 4.2* y *GOLD (ChemPLP score)* que las moléculas **YPC-1** y **YPC-3** son muy similares entre sí, ya que se calculó un *RMSD* por debajo de 1. Mientras que, en las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2**, **YPC-2A**, **YPC-4** y **YPC-5** se obtuvieron valores de *RMSD* por arriba de 4, por lo que las poses obtenidas son diferentes entre estos dos programas.

Además, como se puede observar en la **Figura 15**, se determinaron las poses de unión para las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**: *AutoDock Vina* (azul), *AutoDock 4.2* (verde) y *GOLD (ChemPLP score)*, rojo) en el sitio de unión de la α/β de la tubulina.

Para el caso de los derivados de indol, **YPC-1A** y **YPC-2A**, se puede ver que las poses que toman las moléculas son muy diferentes, ya que cambia la posición del anillo de indol, girando hasta 180° , y por tanto cambia la posición de los anillos de fenilo. Por tanto, los tres programas arrojan resultados diferentes en cuanto a posee e interacciones con el sitio de unión.

En el caso de **YPC-1** y **YPC-3**, la posición de los metilos en los anillos disustituido y trisustituido cambian de posición, así como los metilos de los metoxilos que se

encuentran en las posiciones 5 y 6 del indazol. Por lo que, en los tres programas se observan poses de unión e interacciones similares con el sitio de unión.

Para **YPC-2** y **YPC-5**, se observa que tanto el programa *AutoDock Vina* y *AutoDock 4.2* se mantiene la posición del anillo de indazol, con pequeñas variaciones en la posición de los anillos disustituido y trisustituido, así como en los metoxilos de las moléculas. Sin embargo, el programa *GOLD (ChemPLP score)* gira 180° el anillo de indazol y, por tanto, cambia la posición de los anillos de fenilo en las posiciones 2 y 3 del indazol.

La molécula **YPC-4** presenta poses similares tanto para *AutoDock Vina* como para *AutoDock 4.2*, con variaciones en las posiciones de los anillos disustituidos y trisustituidos. Pero en *GOLD (ChemPLP score)* se puede ver que la posición del anillo de indazol gira aproximadamente 90° y por tanto los anillos disustituido y trisustituido tienen poses diferentes a las observadas en los dos programas anteriores.

Tabla 4. Comparación de RMSD para los tres programas: *AutoDock Vina*, *AutoDock 4.2* y *GOLD (ChemPLP score)*

	<i>AutoDock Vina vs AutoDock 4.2</i>	<i>AutoDock Vina vs GOLD (ChemPLP score)</i>	<i>AutoDock 4.2 vs GOLD (ChemPLP score)</i>
YPC-1	0.283	0.574	0.7
YPC-2	0.323	5.924	5.886
YPC-3	0.229	0.726	0.682
YPC-4	1.287	7.698	7.635
YPC-5	1.241	6.772	6.858
YPC-1A	6.595	5.471	6.481
YPC-2A	5.587	6.511	4.741

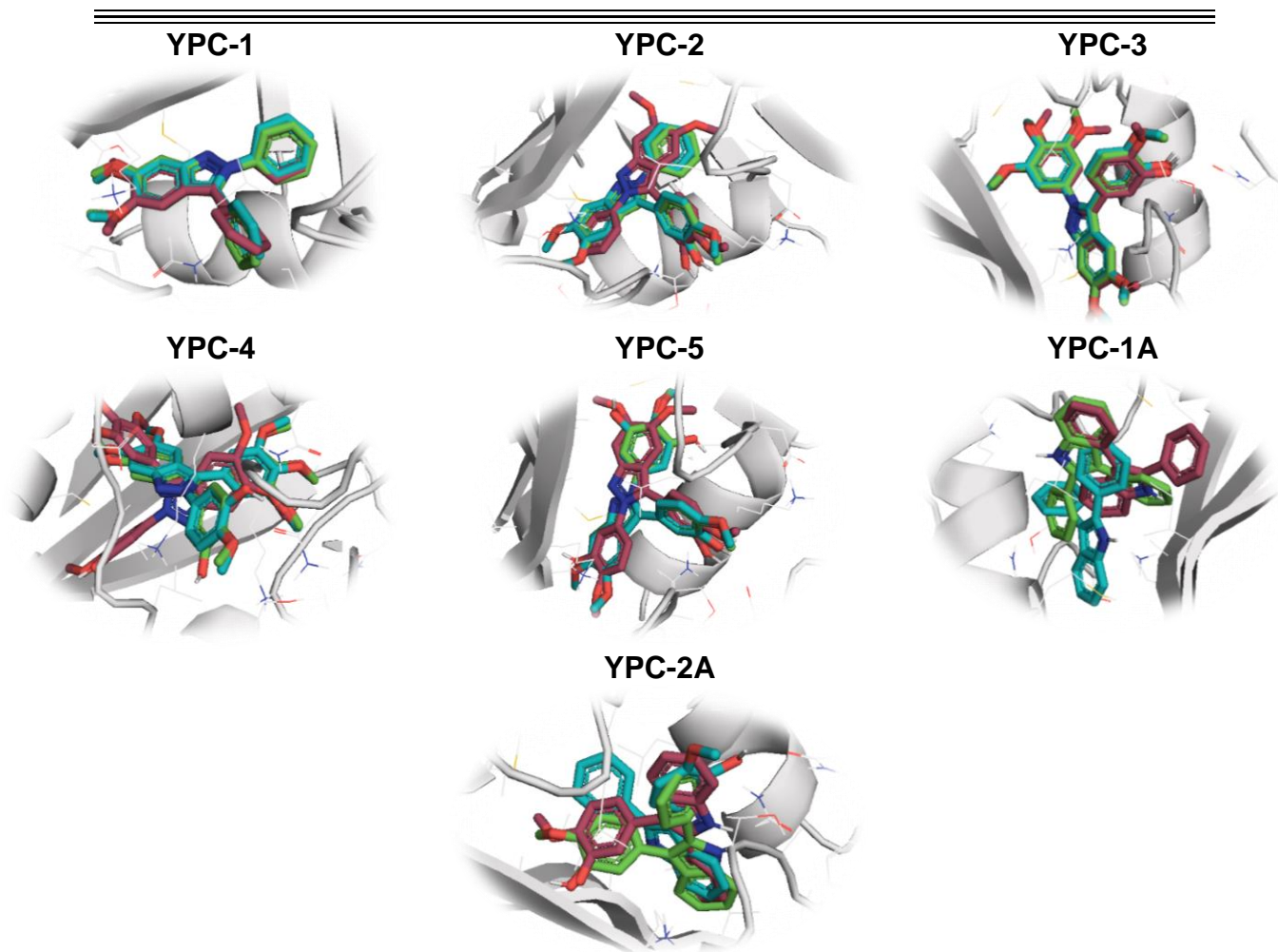


Figura 15. Comparación de las mejores poses de unión ligando-receptor con los tres programas utilizados para las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**: *AutoDock Vina* (azul), *AutoDock 4.2* (verde) y *GOLD* (*ChemPLP score*, rojo).

8.2.4 Interacciones ligando-receptor para YPC-1A, YPC-2A, YPC-1–YPC-5

Se realizó el análisis de las interacciones ligando-receptor para las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2A**, y **YPC-1–YPC-5** comparando las interacciones reportadas con la **CA-4**. Se ha descrito, que en el complejo tubulina-**CA-4** tiene 17 interacciones de gran relevancia; se observa que en el anillo A con 3,4,5-metoxi-sustituido hay interacciones hidrofóbicas formado por los residuos βVal^{238} , βCys^{241} , βLeu^{242} , βLeu^{248} , βAla^{250} , βLeu^{255} , βAla^{316} , βIle^{318} , βAla^{354} y βIle^{378} , mientras que en el anillo B sustituido con 3'-hidroxi-4'-metoxi se encuentra βAsn^{258} y βLys^{352} . Además, se estabiliza mediante interacciones hidrofobas con los residuos αThr^{179} , αAla^{180} ,

αVal^{181} , βMet^{259} , βAla^{316} y βAsn^{349} . Y se forman dos enlaces de hidrógeno entre el 3'-OH y la amida de la cadena principal de αVal^{181} y αThr^{179} [52, 53].

En *AutoDock 4.2*, se determinó que las moléculas **YPC-1**, **YPC-2** presentan una interacción débil tipo π -azufre entre βMet^{259} y el anillo heterocíclico, mientras que el compuesto **YPC-4** presenta una interacción π -azufre entre βMet^{259} y el anillo trisustituido y una interacción π -azufre entre βCys^{241} y el anillo de indazol. También se observa una interacción π -solitario en las moléculas **YPC-1**, **YPC-3** y **YPC-2A** con αThr^{179} y el anillo en la posición 3 para los indazoles (sin sustituyentes y disustituido) y para el anillo en la posición 2 del indol (sin sustituyentes). Asimismo, se observa una interacción de tipo π -amida apilada en **YPC-1**, **YPC-2** y **YPC-1A** con βLys^{254} con el heterociclo de indazol y con el anillo en posición 2 del indol.

En cuanto a la presencia de aceptores de hidrógeno, se visualizó en las moléculas **YPC-3** y **YPC-4**, principalmente en el anillo trisustituido, donde el grupo -OCH₃ en posición *meta* o *para*, qué es el encargado de esta función.

Adicional a lo anterior, se puede concluir que el anillo disustituido favorece la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo -OH de los compuestos (**YPC-2**, **YPC-3**, **YPC-4**, **YPC-5** y **YPC-2A**) y los residuos βAsn^{258} , αAsn^{101} o βLeu^{248} de la proteína. También, se puede ver una interacción de formación de puente de hidrógeno en el compuesto **YPC-5** con el aminoácido βAsp^{251} con el anillo disustituido en la posición 2, sin embargo, esta interacción no se considera como una de las 17 interacciones de la **CA-4**. Además, para la molécula **YPC-1A** se observa la formación de puente de hidrógeno con el aminoácido βAsp^{251} con el -NH del heterociclo de indol.

En todos los casos, se observan las interacciones hidrofóbicas tipo π -alquilo, interacciones carbono-hidrógeno, interacciones de *Van der Waals* e interacciones π - σ , las cuales permiten una mayor estabilidad entre el ligando y el receptor. Como podemos observar en la **Figura 16**, en el panel A se observa la visualización en 3D y en 2D del indol (**YPC-2A**) con mejor energía de unión (-9.60 kcal/mol), interacciones con βAla^{317} , βThr^{353} , βVal^{315} , βThr^{314} , βAsn^{350} y βLys^{254} , diferentes a

las 17 interacciones reportadas para **CA-4**. En el panel B, se tiene la visualización 3D y 2D del indazol (**YPC-3**) con mejor energía de unión (-10.85 kcal/mol), interacciones con β Ala³¹⁷, β Val³¹⁵, β Asn³⁵⁰, β Val³⁵¹, β Thr³¹⁴, β Asn²⁵⁴, β Asp²⁵¹, β Leu²⁵², β Val²³⁸ y β Thr²³⁹, diferentes a las 17 interacciones reportadas para **CA-4** [54].

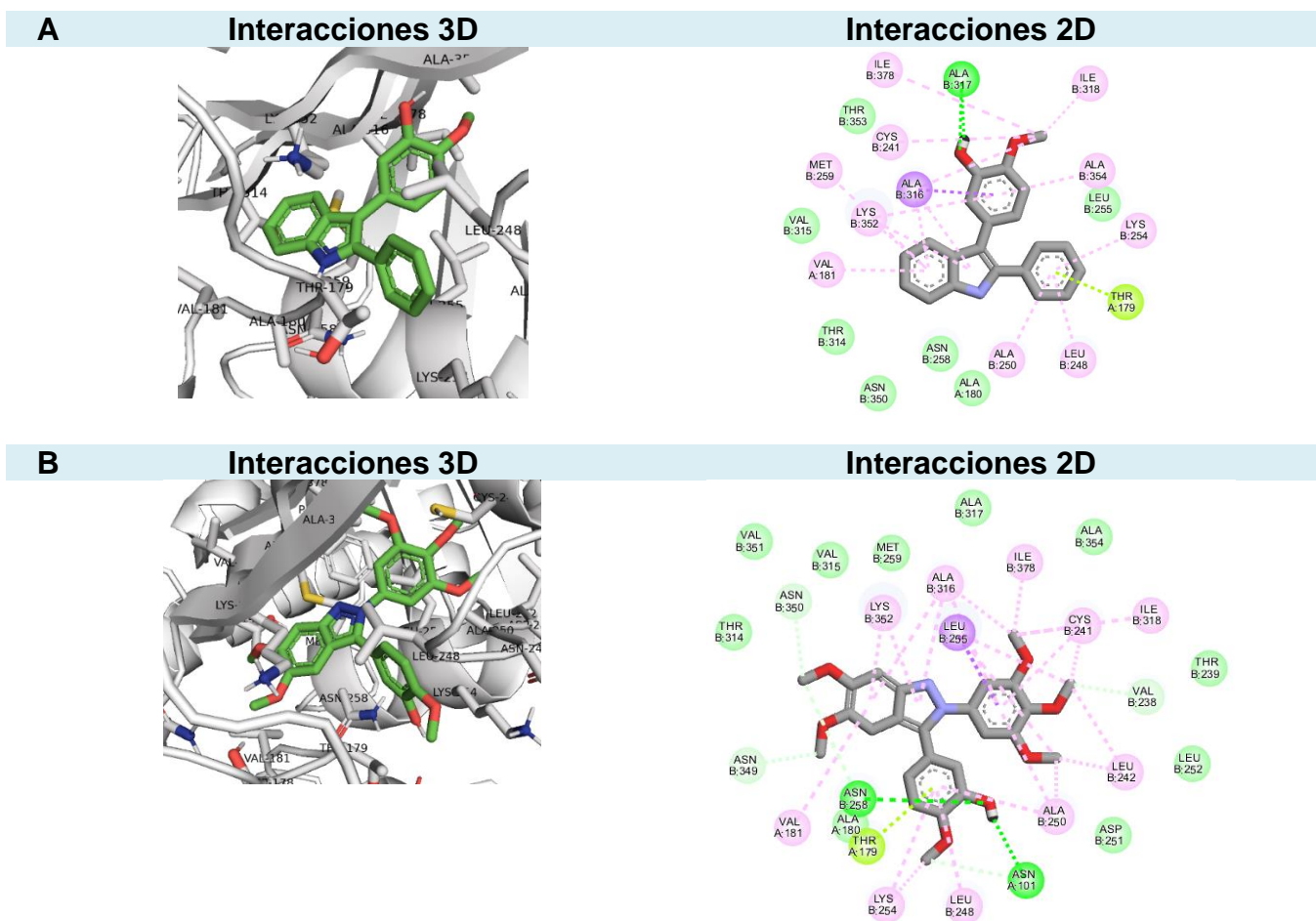


Figura 16. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos **YPC-2A** (A) y **YPC-3** (B) observadas en *AutoDock 4.2*.

De las 17 interacciones reportadas en la literatura, se aprecian de 12 a 17 interacciones para las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**, lo que indica similitud de interacciones ligando-receptor comparado con la **CA-4** (**Tabla 5**). Cabe mencionar que, a pesar de que **YPC-3** muestra las mismas interacciones que **CA-4**, presenta diferente energía de unión, posiblemente a que el tipo de interacciones ligando-receptor son diferentes.

Tabla 5. Principales interacciones observadas en *AutoDock 4.2.* para los compuestos y **CA-**

4

	β VAL ²³⁸	β LEU ²⁴²	β LEU ²⁴⁸	β ALA ²⁵⁰	β LEU ²⁵⁵	β ALA ³¹⁶	β ILE ³¹⁸	β ALA ³⁵⁴	β ILE ³⁷⁸	β LYS ³⁵²	α THR ¹⁷⁹	α ALA ¹⁸⁰	α VAL ¹⁸¹	β MET ²⁵⁹	β ASN ³⁴⁹	β CYS ²⁴¹	β ASN ²⁵⁸	Total
YPC-1	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	12
YPC-2	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	12
YPC-3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17
YPC-4	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16
YPC-5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15
YPC-1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	✓	14
YPC-2A	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	14

Para *AutoDock Vina*, en el caso de las moléculas **YPC-1** y **YPC-4** hay una interacción débil tipo π -azufre entre β Met²⁵⁹ y el heterociclo de indazol (**YPC-1**) y con el anillo trisustituido de **YPC-4**.

En cuanto a los aceptores de hidrógeno, principalmente se encuentran en el anillo TMP, por la presencia del grupo -OCH₃, esto se presenta para las moléculas **YPC-3** y **YPC-4**.

Por otro lado, la formación de puentes de hidrógeno se observa en los grupo -OH que se encuentran en las moléculas **YPC-2**, **YPC-3**, **YPC-4**, **YPC-5** y **YPC-2A** con los residuos α Asn¹⁰¹ y/o β Asn²⁵⁸ con el anillo disustituido de cada molécula. Asimismo, para la molécula **YPC-5** se observa la formación de puente de hidrógeno del anillo disustituido en la posición 2 con β Cys²⁴¹.

En todos los casos, se observan las interacciones hidrofóbicas tipo π -alquilo, interacciones carbono-hidrógeno, así como interacciones de *Van der Waals* e interacciones π - σ , las cuales permiten una mayor estabilidad entre el ligando y el receptor. Como podemos observar en la **Figura 17**, en el panel A se observa la visualización en 3D y en 2D del indol (**YPC-2A**) con energía de unión de -8.4 kcal/mol, interacciones con β Lys²⁵⁴ y β Val³¹⁵, diferentes a las 17 interacciones reportadas para **CA-4**. En el panel B, se tiene la visualización 3D y 2D del indazol

(YPC-3) con energía de unión de -7.0 kcal/mol, interacciones con β Lys²⁵⁴, β Ala³¹⁷, β Thr³¹⁴, β Asn³⁵⁰, β Asn³⁴⁹, β Thr²³⁹, β Asp²⁵¹, β Leu²⁵², β Val²³⁸ y β Val³¹⁵, diferentes a las 17 interacciones reportadas para CA-4 [54].

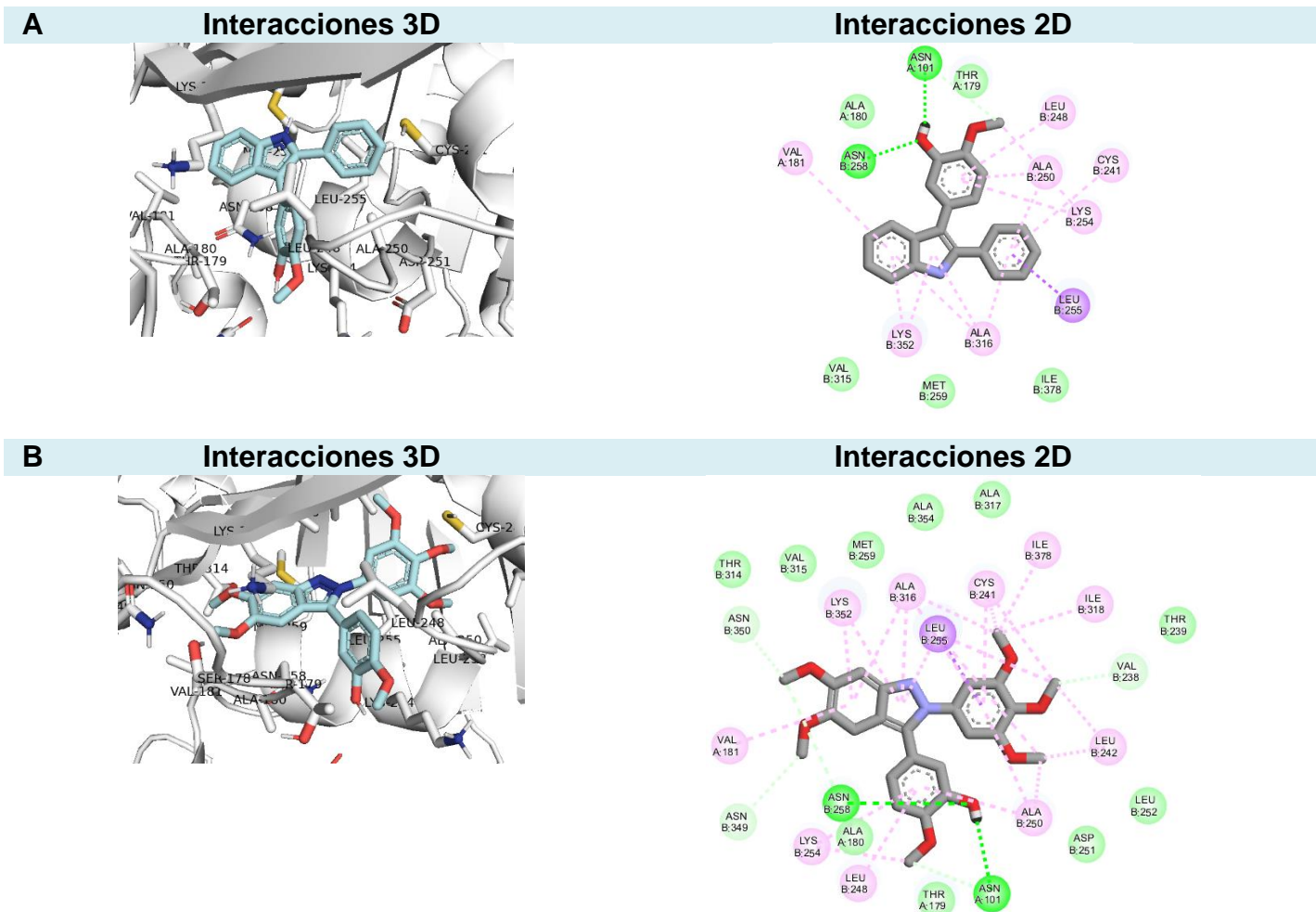


Figura 17. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos YPC-2A (A), YPC-3 (B) observadas en *AutoDock Vina*.

Adicional a lo anterior, de las 17 interacciones reportadas en la literatura para el complejo tubulina-CA-4, se aprecian de 11 a 17 interacciones, como se observa en la **Tabla 6**. Sin embargo, el tipo de interacciones con los residuos para cada compuesto es diferente, por lo que las energías de unión varían respecto al complejo tubulina-CA-4.

Tabla 6. Principales interacciones observadas en *AutoDock Vina* para los compuestos y CA-4

	β VAL ²³⁸	β LEU ²⁴²	β LEU ²⁴⁸	β ALA ²⁵⁰	β LEU ²⁵⁵	β ALA ³¹⁶	β ILE ³¹⁸	β ALA ³⁵⁴	β ILE ³⁷⁸	β LYS ³⁵²	α THR ¹⁷⁹	α ALA ¹⁸⁰	α VAL ¹⁸¹	β MET ²⁵⁹	β ASN ³⁴⁹	β CYS ²⁴¹	β ASN ²⁵⁸	Total
YPC-1	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	11
YPC-2	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	12
YPC-3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	12
YPC-4	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17
YPC-5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15
YPC-1A	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	12
YPC-2A	x	x	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	13

Para el programa de *GOLD* (*ChemPLP score*), se realizó un análisis de las conformaciones dentro del sitio de unión para los compuestos **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**. De manera general, se muestran interacciones tipo π -azufre entre β Met²⁵⁹ con el heterociclo de indazol para el compuesto **YPC-1** y con el anillo de fenilo del indazol en la posición 2 para **YPC-2**. También, se presentan interacciones tipo π -azufre entre β Cys²⁴¹ con el anillo TMP del compuesto **YPC-4** y con el anillo de fenilo de **YPC-1A**. En la molécula **YPC-3** hay presencia de una interacción por π -solitario entre el anillo disustituido y α Thr¹⁷⁹.

La presencia de formadores de puentes de hidrógeno se observó en los compuestos **YPC-2A**, **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-5**. Por lo que, estas interacciones se presentan entre el grupo -OH del anillo disustituido y el residuo α Asn¹⁰¹, β Asn²⁵⁸, y en el caso de **YPC-2A** con β Ala³¹⁷, una interacción que no se presenta con **CA-4**.

Es importante mencionar que, para las moléculas **YPC-3** y **YPC-4** se presentan interacciones no favorables con aminoácidos como: β Leu²⁴⁸, β Ala³⁵⁴, β Met²⁵⁹, β Ile³⁷⁸, β Val²³⁸, α Ala¹⁸⁰ y α Asp²⁵¹, se puede ver en la **Tabla 5**.

En todos los casos, se observan las interacciones hidrofóbicas tipo π -alquilo, interacciones carbono-hidrógeno, así como interacciones de *Van der Waals* e interacciones π - σ , las cuales permiten una mayor estabilidad entre el ligando y el

receptor. Como podemos observar en la **Figura 18**, en el panel A se observa la visualización en 3D y en 2D del indol (**YPC-2A**) con mejor *score* (68.1298), interacciones con β Lys²⁵⁴, β Asn²⁴⁹, β Asp²⁵¹, β Thr³⁵³, β Ala³¹⁷, β Val³¹⁵, β Thr³¹⁴, β Asn³⁵⁰, diferentes a las 17 interacciones reportadas para **CA-4**. En el panel B, se tiene la visualización 3D y 2D del indazol (**YPC-3**) con un *score* de 27.3902, interacciones con β Asp²⁵¹, β Leu²⁵², β Ala²⁵⁶, β Val³¹⁵, β Val³⁵¹, β Thr³¹⁴, β Asn³⁵⁰, β Ala³¹⁷, β Asn²⁴⁹, β Thr²³⁹ y α Ser¹⁷⁸, diferentes a las 17 interacciones reportadas para **CA-4** [54].

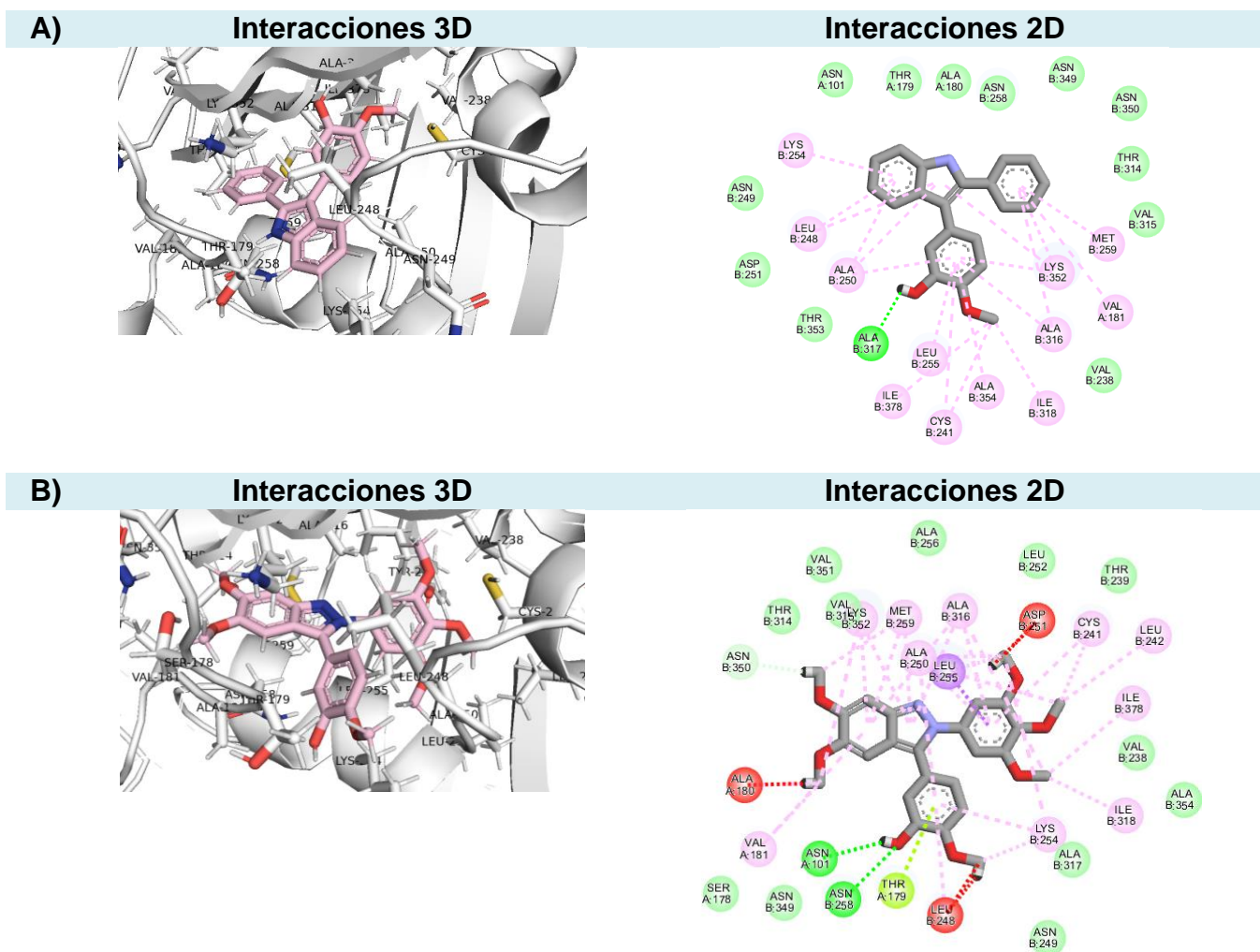


Figura 18. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos **YPC-2A** (A), **YPC-3** (B) observadas en *GOLD* (*ChemPLP score*).

Adicional a lo anterior, de las 17 interacciones reportadas en la literatura, se aprecian de 13 a 17 interacciones para las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1-**

YPC-5, lo que indica similitud de interacciones ligando-receptor comparado con la **CA-4**, sin embargo, se muestran interacciones no favorables para algunas moléculas (**Tabla 7**). Cabe mencionar que, a pesar de que **YPC-3** muestra las mismas interacciones que **CA-4**. Es importante mencionar que, **YPC-3** presenta diferente energía de unión y afinidad con respecto a **CA-4**, debido a que el tipo de interacciones ligando-receptor son diferentes.

Tabla 7. Principales interacciones observadas en *GOLD* (*ChemPLP score*) para los compuestos y **CA-4**

	β VAL ²³⁸	β LEU ²⁴²	β LEU ²⁴⁸	β ALA ²⁵⁰	β LEU ²⁵⁵	β ALA ³¹⁶	β ILE ³¹⁸	β ALA ³⁵⁴	β ILE ³⁷⁸	β LYS ³⁵²	α THR ¹⁷⁹	α ALA ¹⁸⁰	α VAL ¹⁸¹	β MET ²⁵⁹	β ASN ³⁴⁹	β CYS ²⁴¹	β ASN ²⁵⁸	Total
YPC-1	x	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	13
YPC-2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16
YPC-3	✓	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓	17
YPC-4	✓*	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓*	✓*	✓	✓	✓	✓	✓*	x	✓	✓	16
YPC-5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16
YPC-1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	✓	✓	13
YPC-2A	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16

* Moléculas que presentan enlaces no favorables.

Para el programa de *GOLD* (*Gold score*), se realizó un análisis de las conformaciones dentro del sitio de unión para los compuestos **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**. De manera general, se muestran interacciones tipo π -azufre entre β Met²⁵⁹ con el heterociclo de indazol para el compuesto **YPC-1**, **YPC-2** y **YPC-5**. También, hay presencia de una interacción π -amida apilada en las moléculas **YPC-1A**, **YPC-1**, **YPC-2** y **YPC-5** entre el heterociclo de indazol y β Lys²⁵⁴ y β Asn²⁵⁸ (**YPC-5**), para **YPC-1** y **YPC-1A** se presenta en el anillo de fenilo en la posición 2 del indol e indazol con β Lys²⁵⁴.

La presencia de formadores de puentes de hidrógeno se observó en los compuestos **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-5**. Por lo que, estas interacciones se presentan entre el grupo -OH del anillo disustituido y el residuo α Asn¹⁰¹, β Asn²⁵⁸, y en el caso de **YPC-2A** con β Ala³¹⁷, una interacción que no se presenta con **CA-4**. Mientras que, para **YPC-1A** se presenta el puente de hidrógeno con el -NH del indol

con β Asp²⁵¹. Es importante mencionar que, para las moléculas derivadas de indazol se presentan interacciones no favorables con aminoácidos como: β Leu²⁴⁸, α Thr¹⁷⁹, β Ala²⁵⁰, β Asn²⁵⁸, α Ala¹⁸⁰ y β Leu²⁴², se puede ver en la **Tabla 8**.

En todos los casos, se observan las interacciones hidrofóbicas tipo π -alquilo, interacciones carbono-hidrógeno, así como interacciones de *Van der Waals* e interacciones π - σ , las cuales permiten una mayor estabilidad entre el ligando y el receptor. En la **Figura 19**, se observa en el panel A la representación en 3D y en 2D del indol (**YPC-2A**) con mejor *score* (57.3486). En el panel B, se tiene la visualización 3D y 2D del indazol (**YPC-3**) con *score* de 11.2040 [54].

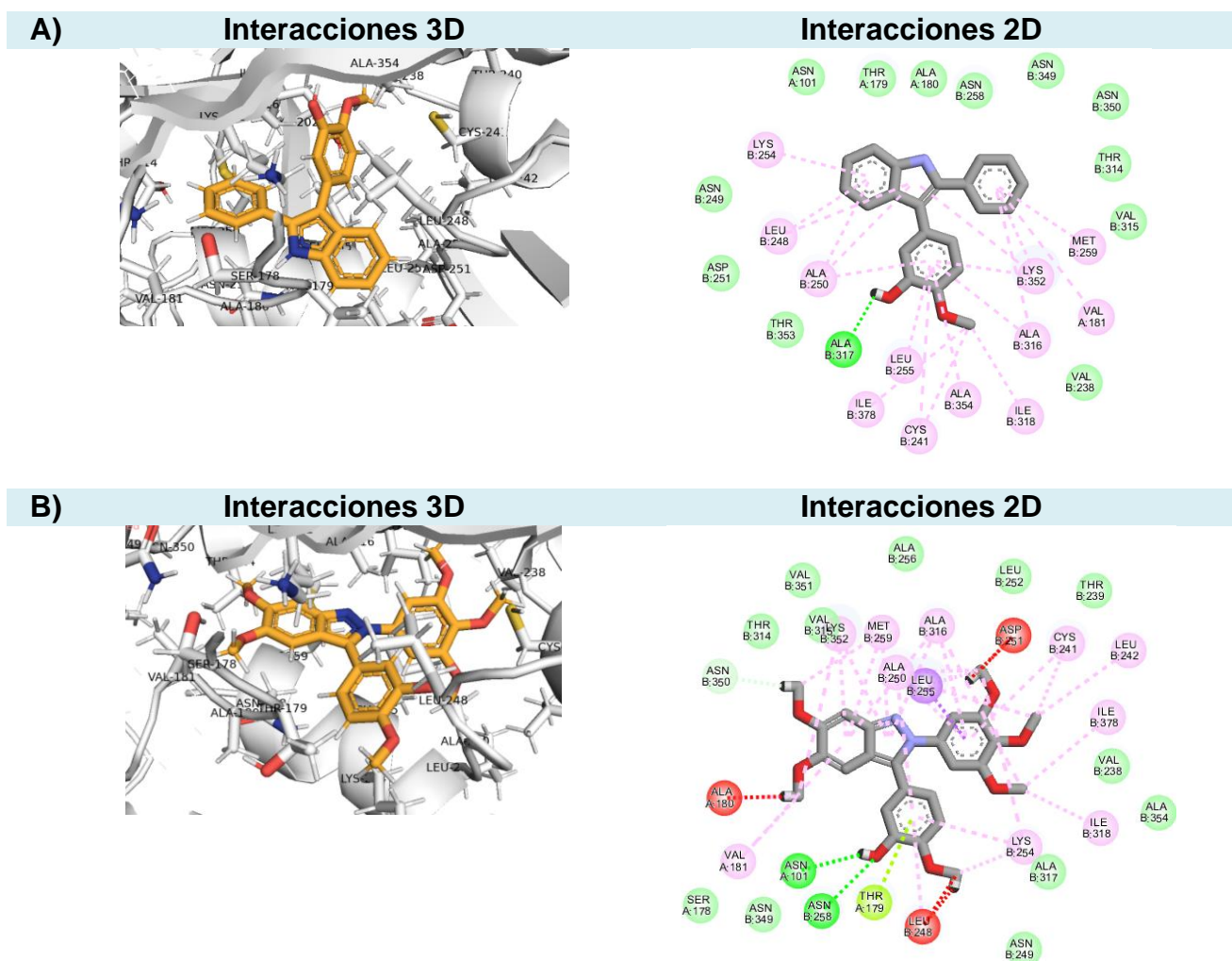


Figura 19. Visualización en 2D, Visualización 3D y principales interacciones observadas para los compuestos **YPC-2A** (A), **YPC-3** (B) observadas en *GOLD* (*Gold score*).

Adicional a lo anterior, de las 17 interacciones reportadas en la literatura, se aprecian de 13 a 17 interacciones para las moléculas **YPC-1A**, **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**, lo que indica similitud de interacciones ligando-receptor comparado con la **CA-4**, sin embargo, se muestran interacciones no favorables para algunas moléculas (**Tabla 8**). Cabe mencionar que, a pesar de que **YPC-3** muestra las mismas interacciones que **CA-4**, sin embargo, presenta diferente energía de unión y afinidad, debido a que el tipo de interacciones ligando-receptor son diferentes.

Tabla 8. Principales interacciones observadas en *GOLD* (*GOLDScore*). para los compuestos y **CA-4**

	β VAL ²³⁸	β LEU ²⁴²	β LEU ²⁴⁸	β ALA ²⁵⁰	β LEU ²⁵⁵	β ALA ³¹⁶	β ILE ³¹⁸	β ALA ³⁵⁴	β ILE ³⁷⁸	β LYS ³⁵²	α THR ¹⁷⁹	α ALA ¹⁸⁰	α VAL ¹⁸¹	β MET ²⁵⁹	β ASN ³⁴⁹	β CYS ²⁴¹	β ASN ²⁵⁸	Total
YPC-1	x	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	13
YPC-2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16
YPC-3	✓	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓	17
YPC-4	✓*	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓*	✓*	✓	✓	✓	✓	✓*	x	✓	✓	16
YPC-5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16
YPC-1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	✓	✓	13
YPC-2A	✓	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	16

* Moléculas que presentan enlaces no favorables.

Es importante tomar en cuenta que el programa *Discovery Studio Visualizer v20.1.0*, considera parámetros de distancia de enlace que pueden afectar como se clasifican o determinan las interacciones ligando-receptor. Por lo que, los choques o *Bump* que se observan en este programa, en otros visualizadores podrían o no observarse.

8.3 Síntesis de las moléculas

Se realizó la síntesis de los compuestos, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 7.4 para los derivados de indol e indazol (**YPC-2A**, **YPC-1 a YPC-5**), en la cual se obtuvieron rendimientos globales que van desde 25 a 36 % de rendimiento. También, se describe en la **Tabla 9** las características físicas de los compuestos, así como sus puntos de fusión.

Tabla 9. Características físicas de los compuestos sintetizados, punto de fusión y rendimiento obtenido

Compuesto	Características	p.f. (°C)	Rendimiento (%)
YPC-2A	Sólido amarillo	168-170	33
YPC-1	Sólido naranja claro	198-199	34
YPC-2	Sólido naranja oscuro	108-110	29
YPC-3	Sólido naranja oscuro	70-75	25
YPC-4	Sólido amarillo oscuro	179-181	34
YPC-5	Sólido amarillo oscuro	142-144	36

8.3.1 Síntesis de derivado de indol: YPC-2A

La síntesis del compuesto derivado de indol se realizó a partir del 2-fenilindol, al que se le realizó una bromación en la posición 3 utilizando NBS con DMF como disolvente, como se menciona en el apartado 7.4.3., y un acoplamiento de Suzuki-Miyaura. El compuesto **YPC-2A** se purificó por cromatografía en columna y recristalización con MeOH. La caracterización se llevó a cabo por resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

En el espectro de ^1H de **YPC- 2A (Figura 20)** se observa la presencia de una señal que corresponden al *H-N* del indol en 8.2 ppm, además se identificó un doblete para H4 en 7.67 ppm, un doblete en H7 en 7.43 ppm, H6 se observó un triplete en 7.14 ppm y un triplete para H5 en 7.28 ppm que corresponden a los anillos del indol. Por otro lado, se observan señales para el fenilo en la posición 2 del indol, H2' y H6' corresponden a un doblete en 7.45 ppm, un triplete para H3' y H5' en 7.33 ppm y H4' en 7.23 ppm se observó un triple de dobles. También, se identificaron señales para H6" se identificó un doble de dobles en 6.90 ppm, un doblete para H2" en 7.04 ppm, H5" mostró un doblete en 6.87 ppm, mientras que el -OH que se encuentra en el anillo disustituido se observa en H7" con un desplazamiento de 5.61 ppm y para -OCH₃ (H8") en 3.93 ppm, (**Tabla 10**).

Tabla 10. Desplazamientos químicos (δ) en RMN de ^1H para YPC-2A

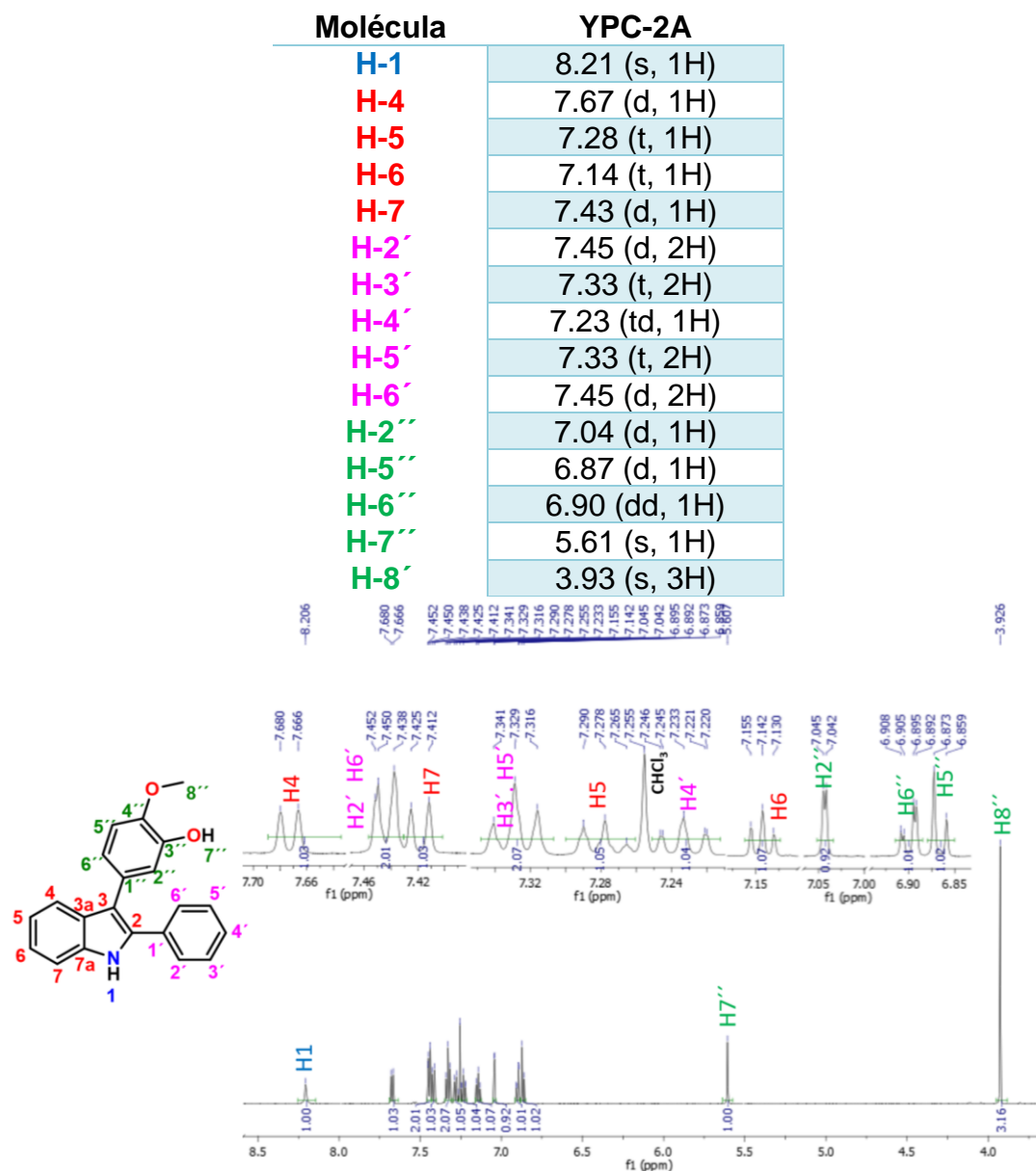


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2A.

Asimismo, en el espectro de ^{13}C se confirma la presencia del producto esperado (**Figura 21**). Se tienen señales para C2 en 135.74 ppm, C7a en 133.78 ppm, C3a en 128.22 ppm, C5 en 122.59 ppm, C6 en 121.94 ppm, C3 en 114.61 ppm, C7 en 116.26 ppm que se asignaron a la estructura del indol. Asimismo, para las señales de C1' en 132.72 ppm, C3' y C5' en 128.64 ppm, C2' y C6' en 128.05 ppm y C4' en 127.58 ppm se asignaron al anillo de fenilo unido al indol en la posición 2.

Finalmente, para el anillo disustituido se observaron señales para C4" en 145.49 ppm, C3" en 145.18 ppm, C1" en 128.64 ppm, C2" en 110.77 ppm, C5" en 110.77 ppm y C8" (correspondiente al grupo -OCH₃) en 55.90 ppm, como se ve en la **Tabla 11**. Tomar en cuenta que la asignación del espectro se realizó a partir de la predicción.

Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ) en RMN de ¹³C para **YPC-2A**

Molécula	YPC-2A
C-2	135.74
C-3	114.61
C-3a	128.28
C-4	119.75
C-5	122.59
C-6	121.94
C7	116.26
C-7a	133.78
C-1'	132.72
C-2'	128.05
C-3'	128.64
C-4'	127.58
C-5'	128.64
C-6'	128.05
C-1''	128.89
C-2''	110.77
C-3''	145.19
C-4''	145.49
C-5'	110.77
C-6'	120.20
C-8'	55.90

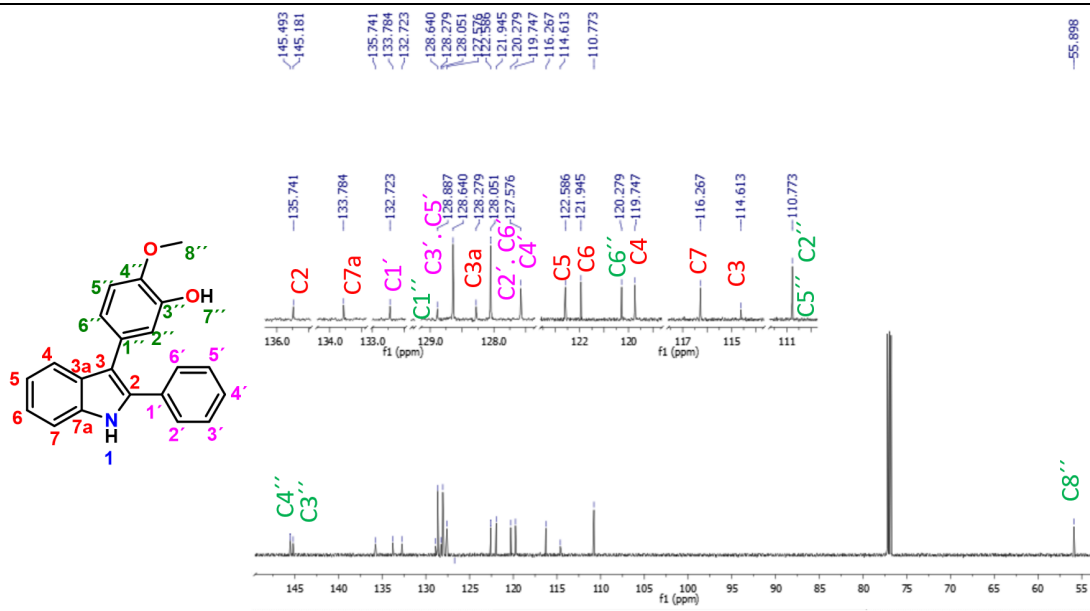


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) del compuesto **YPC-2A**.

8.3.2 Síntesis de derivados de indazol: YPC-1 a YPC-5

La obtención de los derivados de indazol (**YPC-1** a **YPC-5**) se realizó a partir de la formación de la imina utilizando el 2-veratraldehído y la anilina correspondiente, esto se hizo a través de una reacción por ultrasonificación por 2 h. Una vez obtenida la imina, se realizó la formación del 2*H*-indazol utilizando $\text{P}(\text{OEt})_3$ para la ciclación que se lleva a cabo de 3 a 4 h aproximadamente a una temperatura de 150 °C. Posteriormente, se llevó a cabo una bromación en la posición 3 del indazol, para ello se usó 0.5 equivalentes de una solución de Br_2/AcOH 1M que se deja por 1 h a temperatura ambiente (apartado 7.4.5). Finalmente, con un acoplamiento de Suzuki-Miyaura en la posición 3 del indazol se incorporó el fenilo disustituido o trisustituido (apartado 7.4.6).

Se realizó la caracterización de todos los compuestos utilizando RMN ^1H , como se puede ver en la **Tabla 12**, que resume los desplazamientos químicos observados para cada uno de los protones de los compuestos.

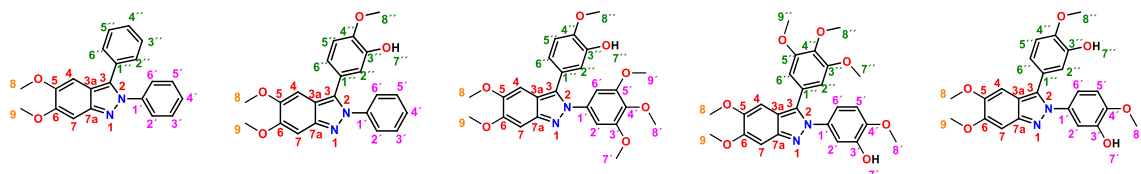
De manera general, se observó que los protones H4 y H7 del indazol se encuentran en un desplazamiento químico de 6.98 a 7.07 ppm y de 6.83 a 6.88 ppm, mientras que para los $-\text{OCH}_3$ en posiciones 5 y 6 se observaron singuletes con un

desplazamiento que va de 3.83 a 3.99 ppm. Por otro lado, para el fenilo que se encuentra en la posición 2, se observó para H2' en un desplazamiento de 6.51 a 7.40 ppm, para el protón H3' y H4' entre 7.35 a 7.44 ppm (**YPC-1** y **YPC-2**), además para H5' se observaron señales que van de 6.77 a 7.35 ppm, para H6' se señalan con un desplazamiento de 6.63 a 7.40 ppm. Para el caso del compuesto con el anillo trisustituido con grupos -OCH₃ (**YPC-3**), H7' se mostró un singulete en 3.71 ppm, para H8' un singulete en 3.86 ppm y para H9' en 3.71 ppm. Para los compuestos con anillo disustituidos con -OCH₃ en posición *para* y el sustituyente -OH en posición *meta* (**YPC-3** y **YPC-4**) se encontró que para H7' y H7'' (grupo -OH) se encuentra en 5.91 ppm para **YPC-3** y para **YPC-4** en 5.81 ppm, así como para H8' y H8'' (grupo -OCH₃) se encuentran un singulete en 3.93 y 3.91 ppm, respectivamente.

Por otro lado, para el fenilo que se encuentra en la posición 3 del indazol se determinó que el protón H2'' se encuentra en 6.49 a 6.95 ppm, el protón H6'' en 6.49 a 7.02 ppm, mientras que H3'' y H4'' se encuentran entre 7.29 a 7.44 ppm para el compuesto **YPC-1** como un multiplete. Asimismo, H5'' se observa en 6.77 a 6.89 ppm (para **YPC-1** a **YPC-3** y **YPC-5**). En el caso del compuesto con TMP (**YPC-4**) se puede determinar los desplazamientos para los protones H7'', H8'' y H9'' en 3.78 a 3.84 ppm. Para **YPC-5** el grupo -OH y el grupo -OCH₃ se encuentran en 3.91 a 3.89 ppm como multipletes, como se ve en la **Figura 22**.

Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ) en RMN de ^1H para los compuestos **YPC-1** a **YPC-5**

5



Molécula	YPC-1	YPC-2	YPC-3	YPC-4	YPC-5
H-4	7.07 (s, 1H)	7.05 (s, 1H)	7.04 (s, 1H)	6.98 (s, 1H)	7.01 (s, 1H)
H-7	6.88 (s, 1H)	6.86 (s, 1H)	6.84 (s, 1H)	6.83 (s, 1H)	6.88 (s, 1H)
H-8	3.99 (s, 3H)	3.98 (s, 3H)	3.98 (s, 3H)	3.84 (s, 3H)	3.96 (s, 3H)
H-9	3.91 (s, 3H)	3.90 (s, 3H)	3.89 (s, 3H)	3.83 (s, 3H)	3.89 (s, 3H)
H-2'	7.44 - 7.29 (m, 10H)	7.40 (d, 2H)	6.63 (s, 2H)	6.51 (d, 1H)	6.79 (s, 1H)
H-3'	7.44 - 7.29 (m, 10H)	7.35 (t, 2H)	-	-	-
H-4'	7.44 - 7.29 (m, 10H)	7.31 (t, 1H)	-	-	-
H-5'	7.44 - 7.29 (m, 10H)	7.35 (t, 2H)	-	6.77 (dd, 1H)	6.80-6.677 (m, 3H)
H-6'	7.44 - 7.29 (m, 10H)	7.40 (d, 2H)	6.63 (s, 2H)	6.99 (d, 1H)	6.92 (d, 1H)
H-7'	-	-	3.71 (s, 6H)	5.81 (s, 1H)	3.91 - 3.89 (m, 11H)
H-8'	-	-	3.86 (s, 3H)	3.91 (s, 3H)	3.91 - 3.89 (m, 11H)
H-9'	-	-	3.71 (s, 6H)	-	-
H-2''	7.44 - 7.29 (m, 10H)	6.95 (d, 1H)	6.79 (dd, 1H)	6.49 (s, 2H)	6.86 (s, 1H)
H-3''	7.44 - 7.29 (m, 10H)	-	-	-	-
H-4''	7.44 - 7.29 (m, 10H)	-	-	-	-
H-5''	7.44 - 7.29 (m, 10H)	6.79 (dd, 1H)	6.89 (d, 1H)	-	6.80 - 6.77 (m, 3H)
H-6''	7.44 - 7.29 (m, 10H)	6.86 (d, 1H)	7.02 (d, 1H)	6.49 (s, 2H)	6.99 (d, 1H)
H-7''	-	5.74 (s, 1H)	5.91 (s, 1H)	3.78 (d, 6H)	3.91 - 3.89 (m, 11H)
H-8''	-	3.93 (s, 3H)	3.93 (s, 3H)	3.84 (s, 3H)	3.91 - 3.89 (m, 11H)
H-9''	-	-	-	3.78 (d, 6H)	-

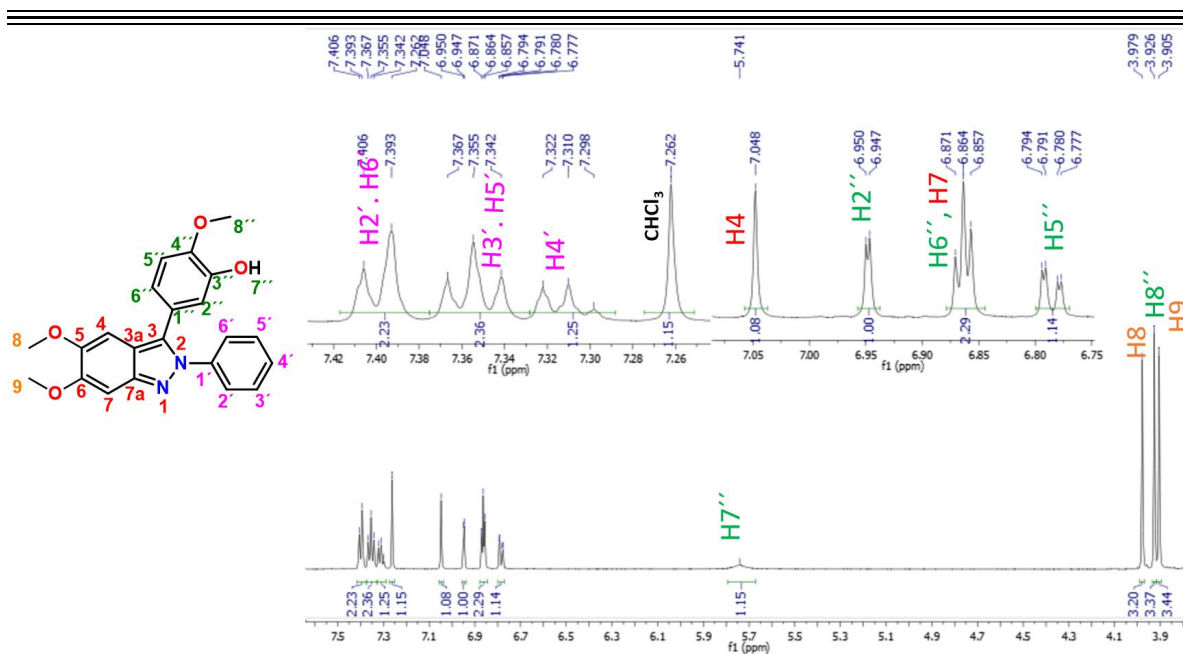


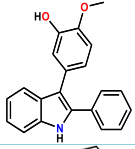
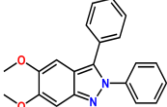
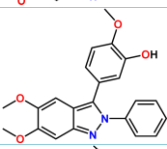
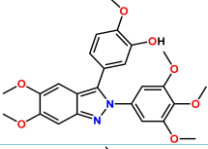
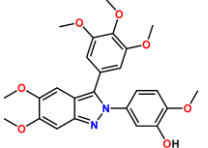
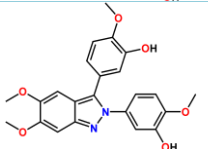
Figura 22. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto YPC-2.

8.4 Pruebas en líneas celulares

8.4.1 Porcentaje de inhibición del crecimiento celular en SK-LU-1 y HeLa

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos YPC-2A, YPC-1–YPC-5; para ello se realizó el ensayo de sulforodamina B (SRB), siguiendo la metodología reportada por Vichai y Kirtikara [103] sobre las líneas celulares humanas de cáncer cervicouterino (HeLa) y de adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1). El ensayo se realizó empleando la CA-4 como control positivo y los compuestos sintetizados, con un tiempo de incubación de las líneas celulares de 48 h, los detalles de la metodología experimental se encuentran en la sección 7.5 de la parte experimental. Se determinó el porcentaje de inhibición celular a una concentración de 50 μM, como se puede observar en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular a 50 μM en las líneas celulares SK-LU-1 y HeLa

		SK-LU-1	HeLa
	Compuesto	% de inhibición a una concentración de 50 μM	% de inhibición a una concentración de 50 μM
	YPC-2A	74.38 \pm 0.96	67.52 \pm 0.34
	YPC-1*	15.61 \pm 4.93	29.10 \pm 3.46
	YPC-2*	59.02 \pm 0.99	56.82 \pm 5.64
	YPC-3	71.28 \pm 5.45	60.20 \pm 2.48
	YPC-4	30.47 \pm 2.23	50.66 \pm 2.30
	YPC-5	56.69 \pm 9.94	41.98 \pm 0.77

*Compuestos que precipitan a 50 μM .

8.4.2 Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50})

Se determinaron las curvas dosis-respuesta gradual para los compuestos **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-2A** en las líneas celulares cancerosas SK-LU-1 y HeLa. Los resultados de las CI_{50} (μM) se expresan como el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar, también se determinó la CI_{50} para el control positivo (**CA-4**) como se observa en la **Tabla 14**. Los compuestos **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-2A** se seleccionaron para determinar la CI_{50} , debido a que se observaron valores altos de porcentaje de inhibición en ambas líneas celulares.

Tabla 14. Valores calculados de CI_{50} (μM) para los compuestos **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-2A**

	YPC-2	YPC-3	YPC-2A	CA-4
SK-LU-1	46.65 \pm 6.32 μM	50.26 \pm 0.84 μM	7.38 \pm 0.15 μM	0.021 \pm 0.002 μM
HeLa	38.31 \pm 7.88 μM	35.68 \pm 2.34 μM	20.39 \pm 0.13 μM	0.014 \pm 0.001 μM

8.4.3 Observación de cambios morfológicos a través de microscopia de campo claro

Se analizaron los cambios morfológicos en células SK-LU-1 y HeLa tratadas con los compuestos **YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5** y la **CA-4** como control positivo.

En el control negativo (células sin tratamiento) observamos la morfología normal de las células, el crecimiento en una monocapa y células poligonales fuertemente adheridas, tanto para SK-LU-1 como en HeLa. En la **Figura 23**, se observa las células con tratamiento **CA-4** a 0.0312 μM para células SK-LU-1 y HeLa, comparadas con células normales (sin tratamiento). Como se describió anteriormente, se presentó la pérdida de la monocapa y el cambio morfológico de células poligonales a células redondeadas, además de que las células no se encuentran adheridas.

La **CA-4** es uno de los agentes citotóxicos con mayor potencia, por lo que se calculó una $CI_{50} = 0.021 \mu M$ en células de adenocarcinoma de pulmón (SK-LU-1) y $CI_{50} = 0.014 \mu M$ en células de cáncer cervicouterino (HeLa).

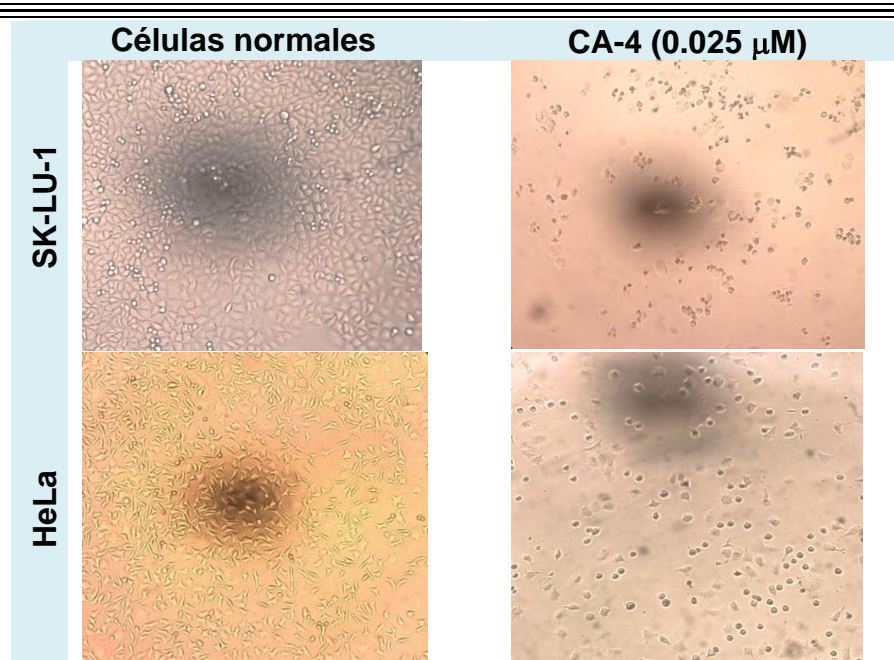


Figura 23. Micrografía de células SKLU-1 y HeLa sin tratamiento y células tratadas con el control positivo (CA-4).

A continuación, se capturaron fotografías del efecto de los compuestos a una concentración de 50 μ M, en el que se observaron cambios morfológicos en las células SK-LU-1. Para los compuestos **YPC-1**, **YPC-4** y **YPC-5** se observó la presencia de células ligeramente redondeadas, en comparación a las células poligonales características de las células SK-LU-1 sin tratamiento, además se puede ver la disminución de la monocapa de células. Sin embargo, el efecto de la inhibición de la formación de la monocapa, así como de la disminución de la población celular, la presencia de células redondeadas y con características de células apoptóticas se observó para los compuestos **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-2A** como se observa en la **Figura 24**.

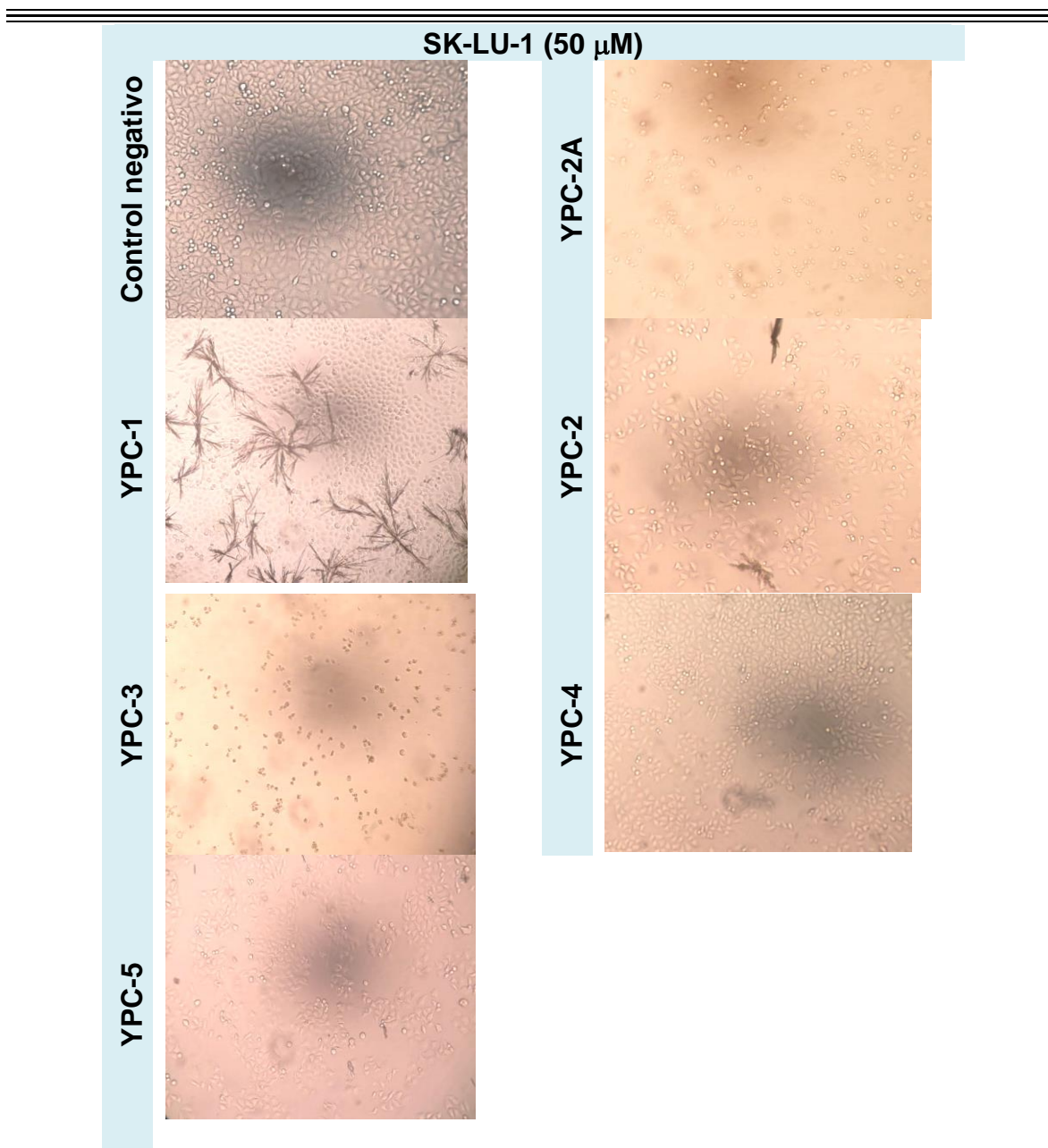


Figura 24. Micrografía de células SK-LU-1 tratadas con los compuestos **YPC-2A**, **YPC-1**–**YPC-5** comparando su efecto con respecto a células sin tratamiento.

Además, se capturaron fotografías del efecto de los compuestos a una concentración de 50 μM, en el que se observaron cambios morfológicos en las células HeLa. Para los compuestos **YPC-1**, **YPC-4** y **YPC-5** se observó la presencia de células redondeadas, en comparación a las células poligonales características de las células HeLa sin tratamiento, además se puede ver la disminución de la monocapa de células cancerosas. Por otro lado, el efecto de la inhibición de la

formación de la monocapa, así como de la disminución de la población celular, la presencia de células redondeadas y con características de células apoptóticas se observó para los compuestos **YPC-2**, **YPC-3** y **YPC-2A** como se muestra en la **Figura 25**.

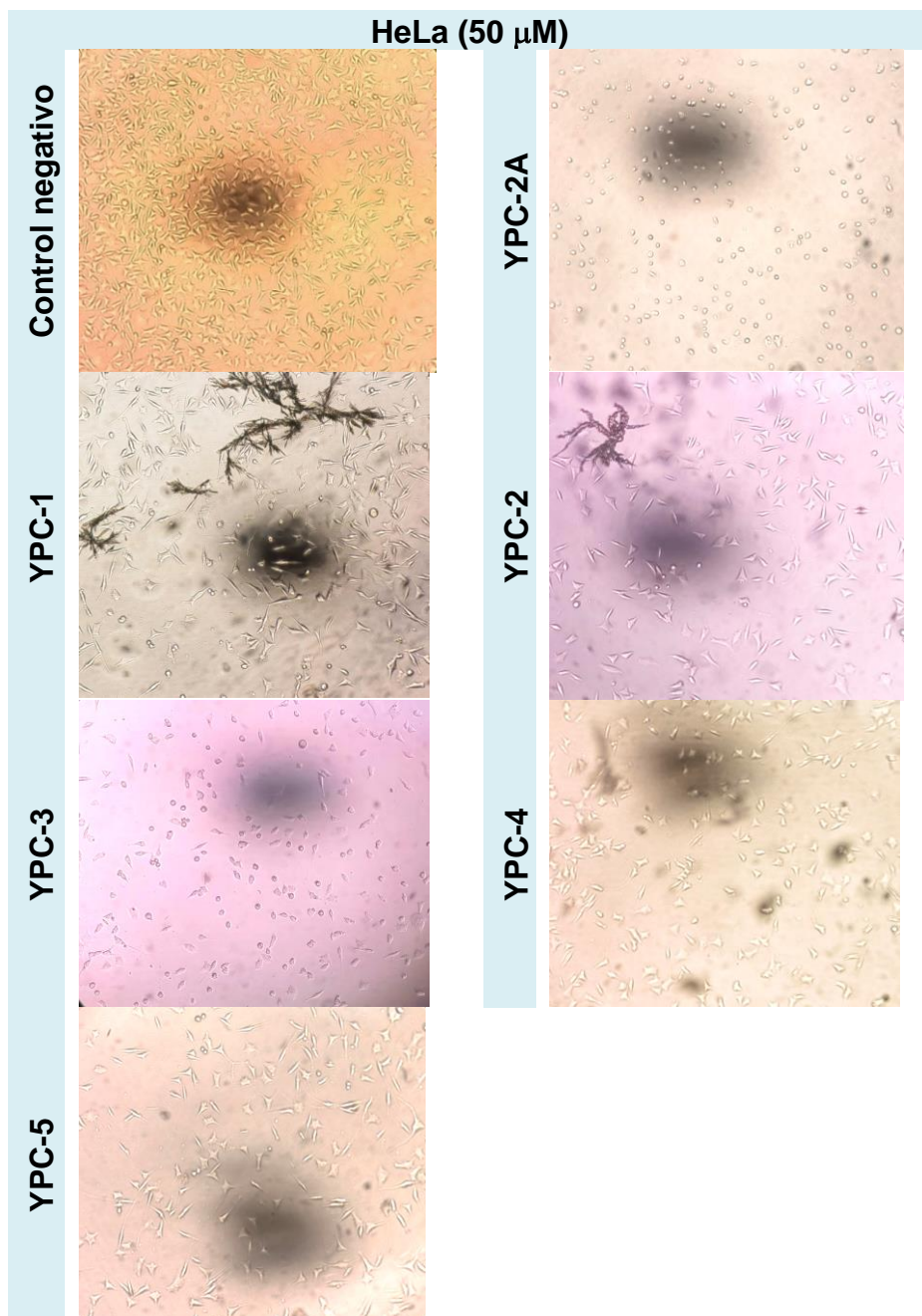


Figura 25. Micrografía de células HeLa tratadas con los compuestos **YPC-2A**, **YPC-1**–**YPC-5** comparando su efecto con respecto a células sin tratamiento.

Finalmente, se obtuvieron las micrografías de las células SK-LU-1 y HeLa tratadas con los compuestos **YPC-2**, **YPC-3**, **YPC-2A**, a los que se les determinó la CI_{50} . Se puede ver un efecto en el aspecto morfológico de las células; hay redondeamiento de las células, pérdida de la formación de la monocapa, disminución en la población de celular y células en estado de apoptosis para todos los compuestos. Sin embargo, en el compuesto **YPC-2A** se puede observar un cambio morfológico más notable, y se tiene que considerar que el cambio se observa a una menor CI_{50} , a comparación de **YPC-2** y **YPC-3**, como se puede observar en la **Figura 26**.

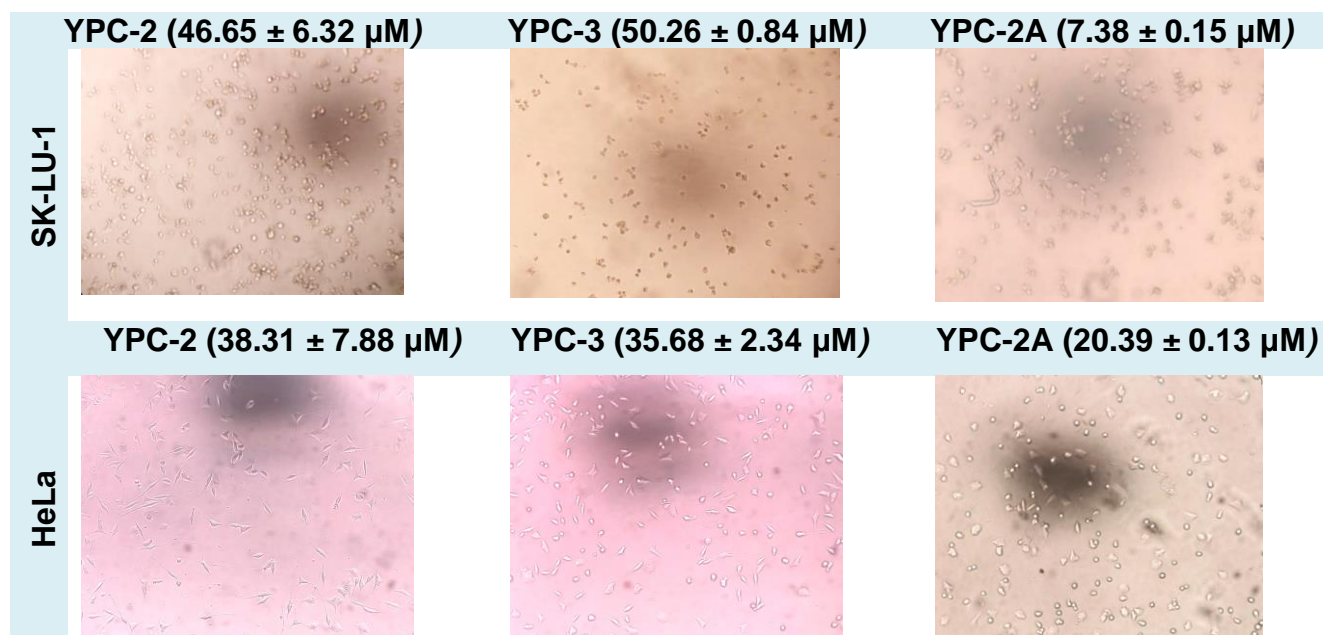


Figura 26. Micrografía de células SK-LU-1 y HeLa tratadas con los compuestos **YPC-2**, **YPC-3**, **YPC-2A**, a los que se calculó la CI_{50} (μM), observando cambios morfológicos importantes.

8.5 Estudios de estructura actividad (SAR) de los compuestos YPC-2A, YPC-1–YPC-5

Se realizó un estudio SAR para todas las moléculas (**YPC-2A**, **YPC-1–YPC-5**) de acuerdo con los estudios de acoplamiento molecular realizados, en los que de manera general se observó que el grupo trimetoxilo como sustituyentes en el anillo de fenilo, se encuentra en una hendidura hidrofóbica de la α/β -tubulina al interactuar

con residuos de aminoácidos como: β Val²³⁸, β Cys²⁴¹, β Leu²⁴², β Val²³⁸, β Ala²⁵⁰, β Leu²⁵⁵, β Ala³¹⁶, β Ile³¹⁸, β Met²⁵⁹, α Val¹⁸¹, β Lys³⁵², β Asn³⁴⁹ y β Ile³⁷⁸, con interacciones de tipo Van der Waals, alquilo y π -alquilo.

Mientras que las moléculas que tienen presente el anillo disustituido (-OH en *meta*), presentan interacciones de tipo puentes de hidrógeno con los residuos de aminoácidos: α Asn¹⁰¹, β Asn²⁵⁸, β Leu²⁴⁸, β Asp²⁵¹ y β Ala³¹⁷; y (-OCH₃ en *para*) se observan interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácidos: β Ile³⁷⁸, β Ile³¹⁸, β Leu²⁴⁸, β Cys²⁴¹, β Ala³¹⁶, β Leu²⁴², β Leu²⁵⁵, β Lys²⁵⁴, β Val²³⁸, α Asn¹⁰¹ y α Thr¹⁷⁹, con interacciones de tipo, C-H, Van der Waals, alquilo y π -alquilo.

Para el caso del heterociclo de indol se observaron interacciones π - σ , π -alquilo y alquilo con residuos de aminoácidos como: β Met²⁵⁹, β Lys²⁵², β Ala³¹⁶, α Ala¹⁸¹, β Leu²⁵⁵, β Ala²⁵⁰, β Cys²⁴¹, β Leu²⁴². Por otro lado, para el heterociclo de indazol se observaron interacciones π -azufre, π -amida apilada, π -alquilo y alquilo con residuos de aminoácidos como: β Met²⁵⁹ y β Cys²⁴¹ (π -azufre), β Lys²⁵⁴ (π -amida apilada), además β Asn²⁵⁸, β Ala³¹⁶, β Lys³⁵², β Leu²⁵⁵, α Val¹⁸¹, β Ala³⁵⁴, β Ala²⁵⁰ y β Leu²⁴⁸.

Los grupos -OCH₃ que se encuentran en las posiciones 5 y 6 del indazol presentan interacciones de tipo C-H con aminoácidos como: α Val¹⁸¹, β Lys³⁵², β Asn³⁵⁰, β Asn³⁴⁹, α Ala¹⁸⁰, β Asn²⁵⁸, así como con residuos como β Gly²³⁷ y β Val²³⁸.

A partir de los diagramas de interacción obtenidos del estudio de acoplamiento molecular, se describieron siete regiones con características estructurales específicas de los compuestos para unirse de manera específica con el sitio de unión de la α/β -tubulina (**Figura 27**). En el panel A, se tiene a la **CA-4** con las principales interacciones reportadas, con los residuos de aminoácido α Thr¹⁷⁹, β Cys²⁴¹ y β Met²⁵⁹, también se observan las principales regiones de interacción de los compuesto **YPC-2A**, **YPC1** a **YPC-5**. En el panel B, se describen las principales regiones estructurales identificadas con una breve explicación.

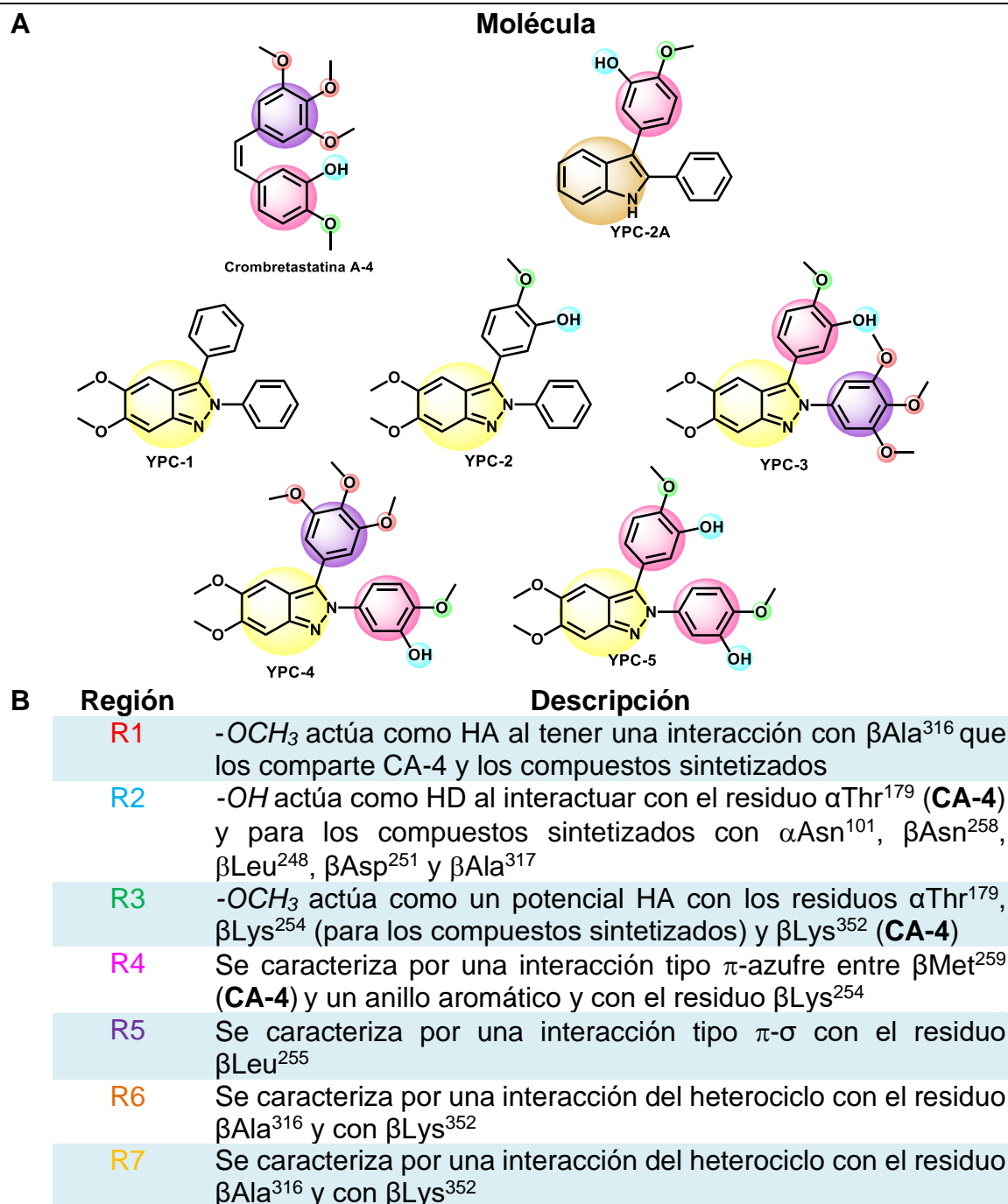


Figura 27. A) Estructura de los compuestos YPC-2A, YPC1 a YPC-5 y CA-4 en la que se marca en color las regiones estructurales que participan en la interacción con el sitio de unión de la α/β-tubulina. B) Regiones estructurales que participan en la interacción con el sitio de unión de la α/β-tubulina y una descripción breve.

Con los estudios SAR se puede decir que, la presencia del grupo trimetoxifenil unido en la posición 2 del heterociclo es necesario, ya que se observó en los estudios de acoplamiento molecular, que el anillo trisustituido presenta una interacción con el residuo de aminoácido β Ala³¹⁶. Además, son importantes las interacciones de puente de hidrógeno entre el anillo disustituido, principalmente con el grupo $-OH$ y los residuos α Asn¹⁰¹, β Asn²⁵⁸, β Leu²⁴⁸, β Asp²⁵¹ y β Ala³¹⁷. Además, se puede sugerir que la actividad biológica de los compuestos está relacionada con la presencia de las 17 interacciones reportadas entre la **CA-4** y el heterodímero α/β -tubulina.

Tomando en cuenta lo anterior, se sugiere que la actividad citotóxica no se ve influenciada por la presencia del grupo $-OCH_3$ en las posiciones 5 y 6 del indazol, de acuerdo con lo ya reportado en la literatura y los resultados obtenidos en los ensayos. Además, el cambio del heterociclo es importante para modular la actividad citotóxica, ya que se observa que hay mayor actividad para el compuesto **YPC-2A** ($Cl_{50} = 7.38 \mu M$ en SK-LU-1 y $Cl_{50} = 20.39 \mu M$ en HeLa) que los derivados de indazol.

Como se mencionó anteriormente, la presencia del anillo disustituido en la posición 3 del heterociclo es de gran relevancia para la actividad citotóxica de los compuestos, ya que aquellos con este patrón de sustitución han demostrado tener actividad en líneas celulares, como es el caso de los compuestos **YPC-2** ($Cl_{50} = 46.65 \mu M$ en SK-LU-1 y $Cl_{50} = 38.31 \mu M$ en HeLa) y **YPC-3** ($Cl_{50} = 50.26 \mu M$ en SK-LU-1 y $Cl_{50} = 35.68 \mu M$ en HeLa).

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de citotoxicidad frente a líneas celulares SK-LU-1 y HeLa, se determinó que el orden decreciente de los compuestos con respecto al porcentaje de inhibición es el siguiente:

Para la línea celular SK-LU-1 el orden es: **YPC-2A** > **YPC-3** > **YPC-2** > **YPC-5** > **YPC-4** > **YPC-1** con valor de % de inhibición de: 74.36 > 71.28 > 59.02 > 56.69 > 30.47 > 15.61 a una concentración de 50 μM , respectivamente, **Figura 28**.

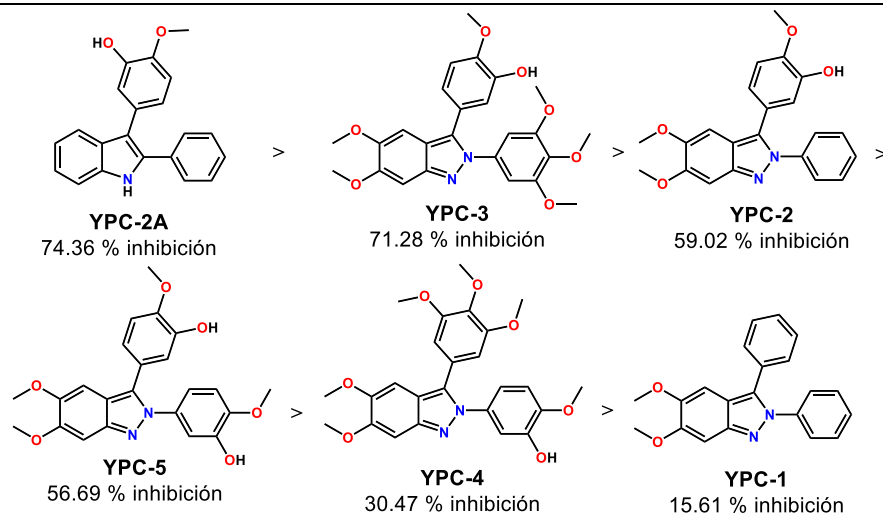


Figura 28. Orden decreciente del porcentaje de inhibición observado para la línea celular SK-LU-1 para los compuestos **YPC-2A**, **YPC-1** a **YPC-5**.

Para la línea celular HeLa el orden es: **YPC-2A** > **YPC-3** > **YPC-2** > **YPC-4** > **YPC-5** > **YPC-1** con valor de % de inhibición de: 67.52 > 60.20 > 56.82 > 50.66 > 41.98 > 29.10 a 50 μ M, respectivamente, **Figura 29**.

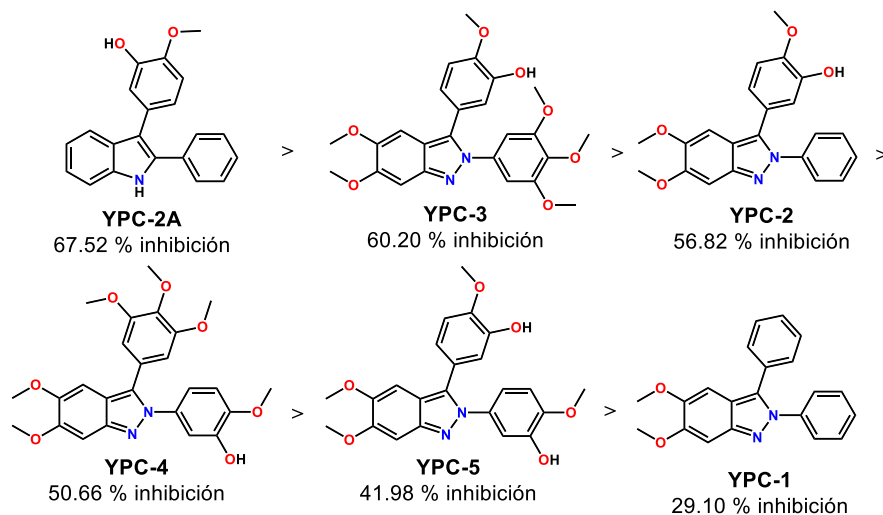


Figura 29. Orden decreciente del porcentaje de inhibición observado en la línea celular HeLa para los compuestos **YPC-2A**, **YPC-1** a **YPC-5**.

Finalmente, es importante mencionar que la diferencia en las CI_{50} , para los compuestos **YPC-2A**, **YPC-2** y **YPC-3** en las líneas celulares SK-LU-1 y HeLa, se puede deber a que en líneas celulares de pulmón se encuentra más expresadas algunas isoformas en comparación con la línea celular de cáncer cervicouterino como la isoforma $\beta VIII$, mientras que se expresan de manera similar en la isoformas βI , βIIa , βIIb , βIVa y βV para líneas celulares de pulmón y cervicouterino de acuerdo con lo observado en el Atlas de Proteínas Humanas [104].

Se ha observado que los microtúbulos que tienen la expresión alterada de tubulinas βI , βII , βIII , βIVa y βV también se ha asociado con la resistencia a fármacos y resultados negativos en varios tipos de cáncer. Por otro lado, se ha observado que al hacer un alineamiento de las isoformas de β -tubulina de humano tomando como referencia la βIII , el porcentaje de identidad con βI es de 77.33 %, βIIa de 91.46 %, βIIb de 91.69 %, para βIVa es de 92.57 %, de βV de 91.89 % y para el caso de βVI es de 92.38 %. Considerando que la βIII es una isoforma dinámica y que se ha visto asociada con la resistencia fármacos como el Paclitaxel principalmente.

Asimismo, es importante mencionar que los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con la α/β -tubulina de *Bos Taurus* (PDB: 5LYJ) que tiene la **CA-4** co-cristalizada, se ha observado que en los alineamientos con los diferentes isotipos de β -tubulina considerando los aminoácidos reportados de la unión de la **CA-4** con el sitio de unión, se observa que la βVal^{238} cambia para la isoforma βI por una isoleucina, en el caso de βCys^{241} cambia para las isoformas βI , βIII y βVI por una serina y la βIle^{318} cambia para las isoformas βIII , βIVa , βV y βVI por una valina. Por lo que, es relevante tomar en cuenta las isoformas de la β -tubulina ya que pueden influenciar en la afinidad de los ligandos con el sitio de unión.

Con lo anterior, se sugiere que el compuesto derivado de indol (**YPC-2A**) va dirigido hacia las isoformas βIII y en βIVa , debido a que presenta mayor citotoxicidad en la línea celular SK-LU-1. Sin embargo, para los compuestos derivados de indazol (**YPC-2** y **YPC-3**) se puede sugerir que van dirigidos hacia la isoforma βVI , ya que su actividad citotóxica es mayor en la línea celular HeLa.

Es importante mencionar que, el programa de acoplamiento molecular que se adapta mejor a mi caso de estudio es *AutoDock 4.2*, ya que los resultados obtenidos en los ensayos biológicos coinciden con lo observado en los puntajes de energías de unión. Mientras que, *GOLD* predijo más cercanamente que el derivado de indol **YPC-2A** tendría mayor afinidad por el sitio de unión y, por tanto, mayor actividad inhibitoria.

9. CONCLUSIONES

Se diseñaron siete moléculas derivadas de indol e indazol a partir de **CA-4**, a las que se les realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando tres programas diferente; se determinaron las interacciones ligando-proteína, las mejores poses y energías de unión.

El programa de acoplamiento molecular más adecuado para mi caso de estudio es *AutoDock 4.2*, por su aproximación a lo observado en los ensayos biológicos.

Se determinaron las características fisicoquímicas de las moléculas propuestas, con las que se determinó si son candidatos a *lead* por su biodisponibilidad oral.

Se lograron sintetizar seis moléculas propuestas, a través de síntesis convencional, además los compuestos obtenidos fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear.

Se realizaron las pruebas de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de pulmón (SK-LU-1) Y cáncer cervicouterino (HeLa) con el ensayo de sulforodamina B.

Se determinó que todos los compuestos propuestos tienen actividad citotóxica a 50 μM , en donde se observaron cambios morfológicos en las células SK-LU-1 y HeLa.

Se calcularon las Cl_{50} de los compuestos **YPC-2A**, **YPC-2** y **YPC-3** con valores que van de 7.38 a 50.26 μM , sin embargo, no se obtuvo una actividad citotóxica mayor que la **CA-4**.

Se realizó un estudio de estructura-actividad (SAR) para cada compuesto, que mostró las regiones estructurales de mayor relevancia que se unen al sitio de unión de la α/β -tubulina.

10. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. [Consulta: Enero, 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Macconail LE, Garraway LA. Clinical implications of the cancer genome. *J Clin Oncol.* 2010;28(35):5219–28. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.27.4944>
3. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(3):339–48. <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2017.041>
4. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005;205(2):275–92. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1706>
5. Nygren P, SBU-group. Swedish Council on Technology Assessment in Health Care. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol.* 2001;40(2–3):166–74. <http://dx.doi.org/10.1080/02841860151116204>
6. 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).* 2021;14(8):815. <http://dx.doi.org/10.3390/ph14080815>
7. INEGI. Estadísticas del día mundial contra el cáncer 4 febrero 2021.
8. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1769–92. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers6031769>
9. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature.* 2019;575(7782):299–309. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
10. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 2002;53(1):615–27. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929>
11. Jr D, Hellman VT, Rosenberg S. *Cancer. Principles and Practice of Oncology.* Lippincott-Raven Publishers; 1997: 375 –513.
12. Boyd M. The future of new drug development. Neiderhuber J, editor. Philadelphia: Decker, B.C., Inc; 1993:11-22.

-
-
13. Roll-Mecak A. The tubulin code in microtubule dynamics and information encoding. *Dev Cell*. 2020;54(1):7–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.008>
 14. Gelfand I. Microtubule dynamics: Mechanism, regulation, and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1991;7(1):93–116. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.7.1.93>
 15. Parker AL, Teo WS, McCarroll JA, Kavallaris M. An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1434. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071434>
 16. Breuss MW, Leca I, Gstrein T, Hansen AH, Keays DA. Tubulins and brain development – The origins of functional specification. *Mol Cell Neurosci*. 2017;84:58–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2017.03.002>
 17. Garnham CP, Roll-Mecak A. The chemical complexity of cellular microtubules: Tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2012;69(7):442–63. <http://dx.doi.org/10.1002/cm.21027>
 18. Risinger AL, Giles FJ, Mooberry SL. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(3):255–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.11.001>
 19. Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(14):2069–84. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000837>
 20. Okouneva T, Hill BT, Wilson L, Jordan MA. The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(5):427–36.
 21. Honore S, Pasquier E, Braguer D. Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(24):3039–56. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5330-x>
 22. Arnst KE, Banerjee S, Chen H, Deng S, Hwang D-J, Li W, et al. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy: ARNST et al. *Med Res Rev*. 2019;39(4):1398–426. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21568>
 23. La Regina G, Coluccia A, Naccarato V, Silvestri R. Towards modern anticancer agents that interact with tubulin. *Eur J Pharm Sci*. 2019;131:58–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.01.028>

-
-
24. Martinez A, Castro A, Dorronsoro I, Alonso M. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. *Medicinal research reviews*. 2002;22(4):373–84.
25. La Regina G, Bai R, Coluccia A, Famiglini V, Pelliccia S, Passacantilli S, et al. New indole tubulin assembly inhibitors cause stable arrest of mitotic progression, enhanced stimulation of natural killer cell cytotoxic activity, and repression of hedgehog-dependent cancer. *J Med Chem*. 2015;58(15):5789–807. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00310>
26. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002;2(1):1–17. <http://dx.doi.org/10.2174/1568011023354290>
27. Liu J, Towle MJ, Cheng H, Saxton P, Reardon C, Wu J, et al. In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic (-)-laulimalide, a marine natural product microtubule stabilizing agent. *Anticancer Res*. 2007;27(3B):1509–18.
28. Mulzer J, Ohler E. Microtubule-stabilizing marine metabolite laulimalide and its derivatives: synthetic approaches and antitumor activity. *Chem Rev*. 2003;103(9):3753–86. <http://dx.doi.org/10.1021/cr940368c>
29. Mooberry SL, Tien G, Hernandez AH, Plubrukarn A, Davidson BS. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res*. 1999;59(3):653–60.
30. Bhargava S, Kulkarni R, Dewangan B, Kulkarni N, Jiaswar C, Kumar K, et al. Microtubule stabilising peptides: new paradigm towards management of neuronal disorders. *RSC Med Chem*. 2023;14(11):2192–205. <http://dx.doi.org/10.1039/d3md00012e>
31. Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med*. 2013;4(11):1231–5.
32. Duflos A, Kruczynski A, Barret J-M. Novel aspects of natural and modified Vinca alkaloids. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2012;2(1):55–70. <http://dx.doi.org/10.2174/1568011023354452>

-
-
33. Himes RH. Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol Ther.* 1991;51(2):257–67. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90081-v](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(91)90081-v)
34. Lobert S, Vulevic B, Correia JJ. Interaction of vinca alkaloids with tubulin: a comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry.* 1996;35(21):6806–14. <http://dx.doi.org/10.1021/bi953037i>
35. Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med Res Rev.* 2008;28(1):155–83. <http://dx.doi.org/10.1002/med.20097>
36. Eli S, Castagna R, Mapelli M, Parisini E. Recent approaches to the identification of novel microtubule-targeting agents. *Front Mol Biosci.* 2022;9:841777. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2022.841777>
37. 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.* 2019;29(15):1865–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.05.042>
38. Yang J, Wang Y, Wang T, Jiang J, Botting CH, Liu H, et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun.* 2016;7(1):12103. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12103>
39. Prota AE, Setter J, Waight AB, Bargsten K, Murga J, Diaz JF, et al. Pironetin binds covalently to α Cys316 and perturbs a major loop and helix of α -tubulin to inhibit microtubule formation. *J Mol Biol.* 2016;428(15):2981–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.023>
40. Lopus M, Oroudjev E, Wilson L, Wilhelm S, Widdison W, Chari R, et al. Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(10):2689–99. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0644>
41. Prota AE, Bargsten K, Diaz JF, Marsh M, Cuevas C, Liniger M, et al. A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(38):13817–21. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1408124111>

-
-
42. Rai A, Kumar A, Shree P, Haque Z ul, Kumari S, Yadav SP, et al. Colchicine in the management of oral submucous fibrosis: A systematic review, meta-analysis, and GRADE-based assessment of certainty of evidence. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2023;75(4):4125–36. <http://dx.doi.org/10.1007/s12070-023-03876-1>
43. Owellen RJ, Owens AH Jr, Donigian DW. The binding of vincristine, vinblastine and colchicine to tubulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;47(4):685–91. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x\(72\)90546-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x(72)90546-3)
44. Avedaño C, Menéndez JC. Anticancer drugs targeting tubulin and microtubules. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.* 2008;229–49.
45. Ji Y-T, Liu Y-N, Liu Z-P. Tubulin colchicine binding site inhibitors as vascular disrupting agents in clinical developments. *Curr Med Chem.* 2015;22(11):1348–60. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867322666150114163732>
46. Dark GG, Hill SA, Prise VE, Tozer GM, Pettit GR, Chaplin DJ. Combretastatin A-4, an Agent That Displays Potent and Selective Toxicity toward Tumor Vasculature. *Cancer Res.* 1997;57:1829–34
47. Tron GC, Pirali T, Sorba G, Pagliai F, Busacca S, Genazzani AA. Medicinal chemistry of combretastatin A4: Present and future directions. *J Med Chem.* 2006;49(11):3033–44. <http://dx.doi.org/10.1021/jm0512903>
48. Pettit GR, Singh SB, Niven ML, Hamel E, Schmidt JM. Isolation, structure, and synthesis of combretastatins A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from *Combretum caffrum*. *J Nat Prod.* 1987;50(1):119–31. <https://doi.org/10.1021/np50049a016>
49. Nam N-H. Combretastatin A-4 Analogues as Antimitotic Antitumor Agents. *Curr Med Chem.* 2003;10(17):1697–722. <https://dx.doi.org/10.2174/0929867033457151>
50. Herrera-Vázquez FS, Matadamas-Martínez F, Aguayo-Ortiz R, Dominguez L, Ramírez-Apan T, Yépez-Mulia L, et al. Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazoline derivatives as potential tubulin polymerization inhibitors. *ChemMedChem.* 2020;15(19):1802–12. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202000185>

-
-
51. Jaroch K, Karolak M, Górski P, Jaroch A, Krajewski A, Ilnicka A, et al. Combretastatins: In vitro structure-activity relationship, mode of action and current clinical status. *Pharmacological Reports*. 2016;68(6):1266–75. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.08.007>
52. Karatoprak GŞ, Küpeli Akkol E, Genç Y, Bardakçı H, Yücel Ç, Sobarzo-Sánchez E. Combretastatins: An Overview of Structure, Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *Molecules*. 2020;25(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112560>
53. Gaspari R, Prota AE, Bargsten K, Cavalli A, Steinmetz MO. Structural Basis of cis- and trans-Combretastatin Binding to Tubulin. *Chem*. 2017;2(1):102–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chempr.2016.12.005>
54. Hearn BR, Shaw SJ, Myles DC. Microtubule Targeting Agents. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. 2007;11:81–110.
55. do Amaral DN, Cavalcanti BC, Bezerra DP, Ferreira PMP, Castro R de P, Sabino JR, et al. Docking, synthesis and antiproliferative activity of N-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues. *PLoS One*. 2014;9(3):e85380. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085380>
56. Mikstacka R, Stefański T, Rózański J. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. *Cell Mol Biol Lett*. 2013;18(3):368–97. <https://doi.org/10.2478/s11658-013-0094-z>
57. Ma M, Sun L, Lou H, Ji M. Synthesis and biological evaluation of Combretastatin A-4 derivatives containing a 30 -O-substituted carbonic ether moiety as potential antitumor agents. *Chem Cent J* 2013;7(1):179. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-179>
58. Lipkus AH, Yuan Q, Lucas KA, Funk SA, Bartelt WF III, Schenck RJ, et al. Structural diversity of organic chemistry. A scaffold analysis of the CAS registry. *J Org Chem*. 2008;73(12):4443–51. <http://dx.doi.org/10.1021/jo8001276>
59. García-Valverde M, Torroba T. Sulfur-nitrogen heterocycles. *Molecules*. 2005;10(2):318–20. <http://dx.doi.org/10.3390/10020318>

-
-
60. Sierański T. The intricacies of the stacking interaction in a pyrrole–pyrrole system. *Struct Chem.* 2016;27(4):1107–20. <http://dx.doi.org/10.1007/s11224-015-0732-3>
61. Sravanthi TV, Manju SL. Indoles — A promising scaffold for drug development. *Eur J Pharm Sci.* 2016;91:1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.025>
62. Lakhdar S, Westermaier M, Terrier F, Goumont R, Boubaker T, Ofial AR, et al. Nucleophilic reactivities of indoles. *J Org Chem.* 2006;71(24):9088–95. <http://dx.doi.org/10.1021/jo0614339>
63. Sharma V, Kumar P, Pathak D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review. *J Heterocycl Chem.* 2010;47(3):491–502. <http://dx.doi.org/10.1002/jhet.349>
64. Sachdeva H, Mathur J, Guleria A. Indole derivatives as potential anticancer agents: A review. *J Chil Chem Soc.* 2020;65(3):4900–7. <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072020000204900>
65. Kaushik N, Kaushik N, Attri P, Kumar N, Kim C, Verma A, et al. Biomedical importance of indoles. *Molecules.* 2013;18(6):6620–62. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18066620>
66. Dadashpour S, Emami S. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. *Eur J Med Chem.* 2018;150:9–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.065>
67. Patil R, Patil SA, Beaman KD, Patil SA. Indole molecules as inhibitors of tubulin polymerization: potential new anticancer agents, an update (2013–2015). *Future Med Chem.* 2016;8(11):1291–316. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2016-0047>
68. Qin J, Cheng W, Duan Y-T, Yang H, Yao Y. Indazole as a privileged scaffold: The derivatives and their therapeutic applications. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021;21(7):839–60. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520620999200818160350>
69. Cerecetto H, Gerpe A, Gonzalez M, Aran V, de Ocariz C. Pharmacological properties of indazole derivatives: Recent developments. *Mini Rev Med Chem.* 2005;5(10):869–78. <http://dx.doi.org/10.2174/138955705774329564>
70. Kuhn P-S, Büchel GE, Jovanović KK, Filipović L, Radulović S, Rapta P, et al. Osmium(III) analogues of KP1019: Electrochemical and chemical synthesis,

-
-
- spectroscopic characterization, X-ray crystallography, hydrolytic stability, and antiproliferative activity. *Inorg Chem.* 2014;53(20):11130–9. <http://dx.doi.org/10.1021/ic501710k>
71. Dong J, Zhang Q, Wang Z, Huang G, Li S. Recent advances in the development of indazole-based anticancer agents. *ChemMedChem.* 2018;13(15):1490–507. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201800253>
72. López-Vallejo F, Castillo R, Yépez-Mulia L, Medina-Franco JL. Benzotriazoles and indazoles are scaffolds with biological activity against *Entamoeba histolytica*. *SLAS Discov.* 2011;16(8):862–8. <http://dx.doi.org/10.1177/1087057111414902>
73. Puri S, Sawant S, Juvele K. A comprehensive review on the indazole based derivatives as targeted anticancer agents. *J Mol Struct.* 2023;1284(135327):135327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135327>
74. Denya I, Malan SF, Joubert J. Indazole derivatives and their therapeutic applications: a patent review (2013-2017). *Expert Opin Ther Pat.* 2018;28(6):441–53. <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2018.1472240>
75. Bellesoeur A, Carton E, Alexandre J, Goldwasser F, Huillard O. Axitinib in the treatment of renal cell carcinoma: design, development, and place in therapy. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:2801–11. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s109640>
76. Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6). <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061578>
77. G. Grothaus P, M. Cragg G, J. Newman D. Plant natural products in anticancer drug discovery. *Curr Org Chem.* 2010;14(16):1781–91. <http://dx.doi.org/10.2174/138527210792927708>
78. Newman DJ, Cragg GM, Holbeck S, Sausville EA. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2002;2(4):279–308. <http://dx.doi.org/10.2174/1568009023333791>
79. Hura N, Sawant AV, Kumari A, Guchhait SK, Panda D. Combretastatin-inspired heterocycles as antitubulin anticancer agents. *ACS Omega.* 2018;3(8):9754–69. <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.8b00996>

-
-
80. Nepali K, Sharma S, Sharma M, Bedi PMS, Dhar KL. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur J Med Chem.* 2014;77:422–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018>
81. Kerru N, Singh P, Koorbanally N, Raj R, Kumar V. Recent advances (2015–2016) in anticancer hybrids. *Eur J Med Chem.* 2017;142:179–212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.033>
82. Fortin S, Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2013;8(8):1029–47. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2013.798296>
83. Flynn BL, Hamel E, Jung MK. One-pot synthesis of benzo[b]furan and indole inhibitors of tubulin polymerization. *J Med Chem.* 2002;45(12):2670–3. <http://dx.doi.org/10.1021/jm020077t>
84. Cui Y-J, Ma C-C, Zhang C-M, Tang L-Q, Liu Z-P. The discovery of novel indazole derivatives as tubulin colchicine site binding agents that displayed potent antitumor activity both in vitro and in vivo. *Eur J Med Chem.* 2020;187(111968):111968. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111968>
85. Kaushik M. A review of innovative Chemical drawing and Spectra prediction computer software. *Mediterr J Chem.* 2014;3(1):759–66. <http://dx.doi.org/10.13171/mjc.3.1.2014.04.04.16>
86. 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.* 2017;7(1). <http://dx.doi.org/10.1038/srep42717>
87. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* 2012;4(1). <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
88. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785–91. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256>

-
-
89. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins*. 2003;52(4):609–23. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10465>
90. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235–42. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
91. Delano WL. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 News Protein Crystallogr*. 2002;40(1):82–92.
92. Land H, Humble MS. YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 43–67.
93. 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*. 2004;25(13):1605–12. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>
94. 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*. 2010;31(2):455–61. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>
95. Bentham Science Publisher Bentham Science Publisher. Scoring functions for protein-ligand docking. *Curr Protein Pept Sci*. 2006;7(5):407–20. <http://dx.doi.org/10.2174/138920306778559395>
96. Bell EW, Zhang Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminform*. 2019;11(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>
97. Toworakajohnkun N, Sukwattanasinitt M, Rashatasakhon P. N-Bromosuccinimide mediated synthesis of triazatruxenes from indoles. *Tetrahedron Lett*. 2017;58(43):4149–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.09.061>
98. Ishiyama T, Murata M, Miyaura N. Palladium(0)-catalyzed cross-coupling reaction of alkoxydiboron with haloarenes: A direct procedure for arylboronic esters. *J Org Chem*. 1995;60(23):7508–10. <http://dx.doi.org/10.1021/jo00128a024>

-
-
99. Rodríguez-Villar K, Hernández-Campos A, Yépez-Mulia L, Sainz-Espuñes T del R, Soria-Arteche O, Palacios-Espinosa JF, et al. Design, synthesis and anticandidal evaluation of indazole and pyrazole derivatives. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(3):176. <http://dx.doi.org/10.3390/ph14030176>
100. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1Pll of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46(1–3):3–26. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
101. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*. 2002;45(12):2615–23. <http://dx.doi.org/10.1021/jm020017n>
102. Muegge I, Heald SL, Brittelli D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J Med Chem*. 2001;44(12):1841–6. <http://dx.doi.org/10.1021/jm015507e>
103. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
104. TThul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci*. 2018;27(1):233–44. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3307>
105. Matadamas-Martínez F, Yépez-Mulia L, Pérez-Koldenkova V, Cortés-Benítez F, Leyte-Lugo M, Palacios-Espinosa JF, et al. Synthesis and antitumor activity of 2,3-diphenyl-2*H*-indazole derivatives as potent antitubulin agents. *ChemistrySelect*. 2022;7(27). <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202202056>

11. ANEXO I

ANEXO I
Espectros de RMN

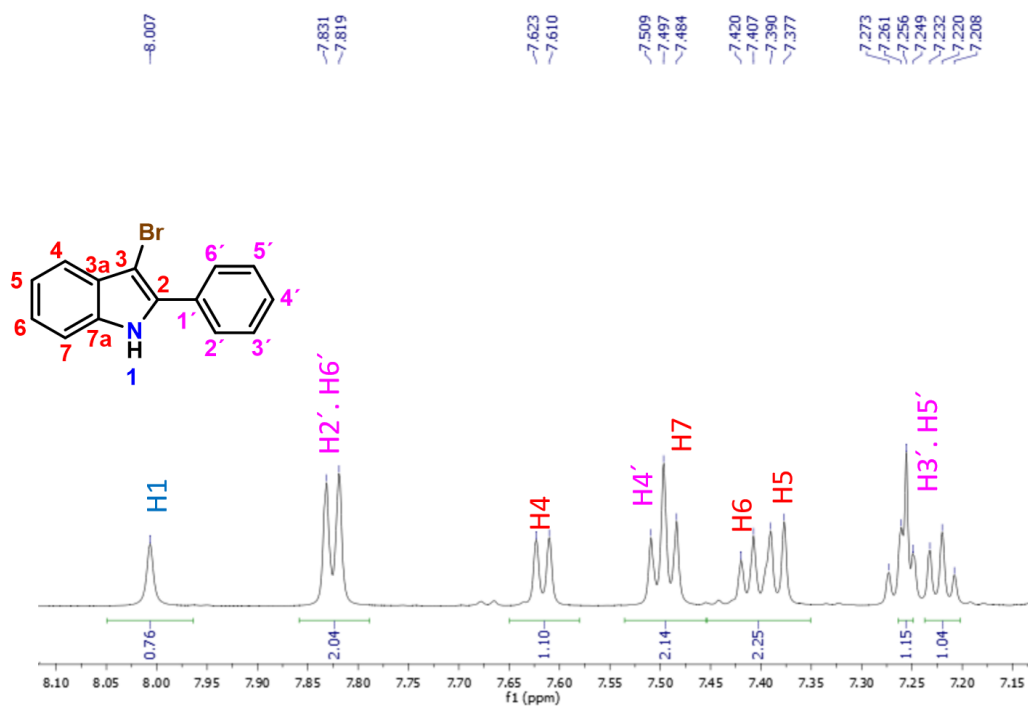


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto **1a**.

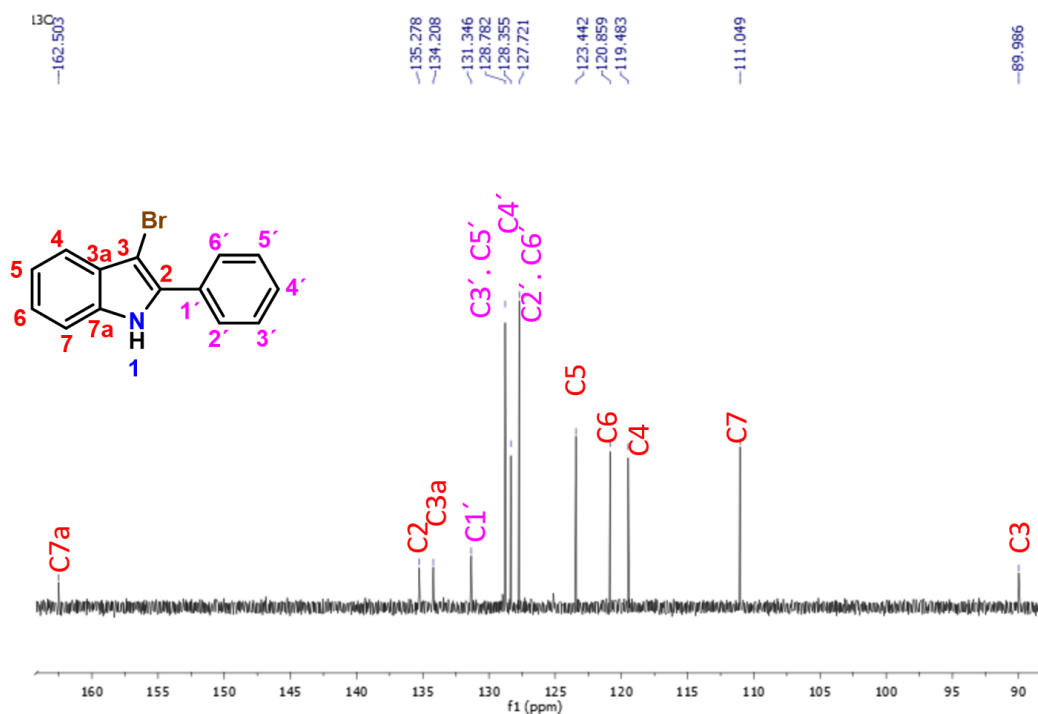


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) del compuesto **1a**.

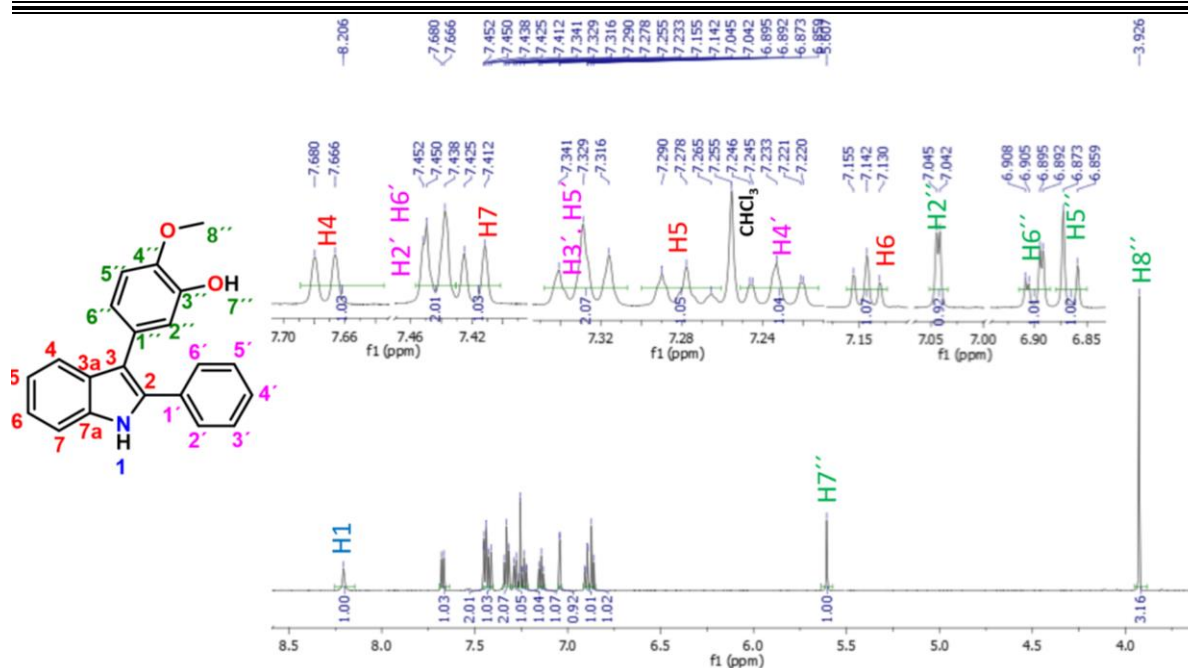


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2A.

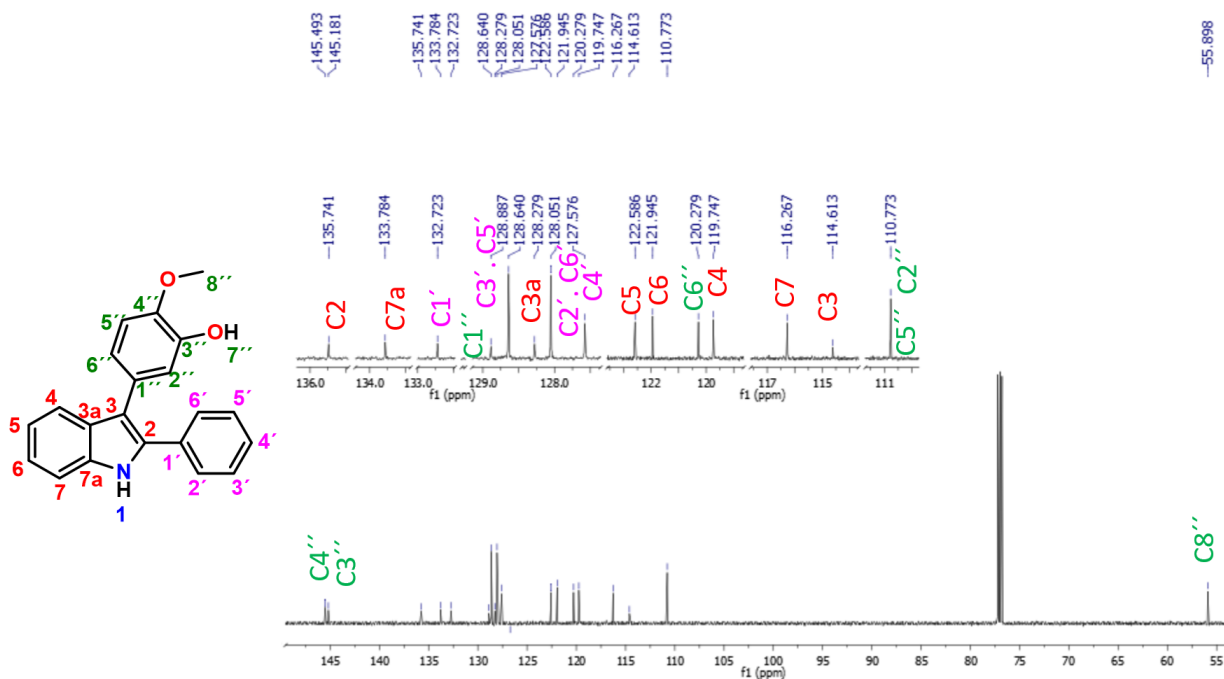


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-2A.

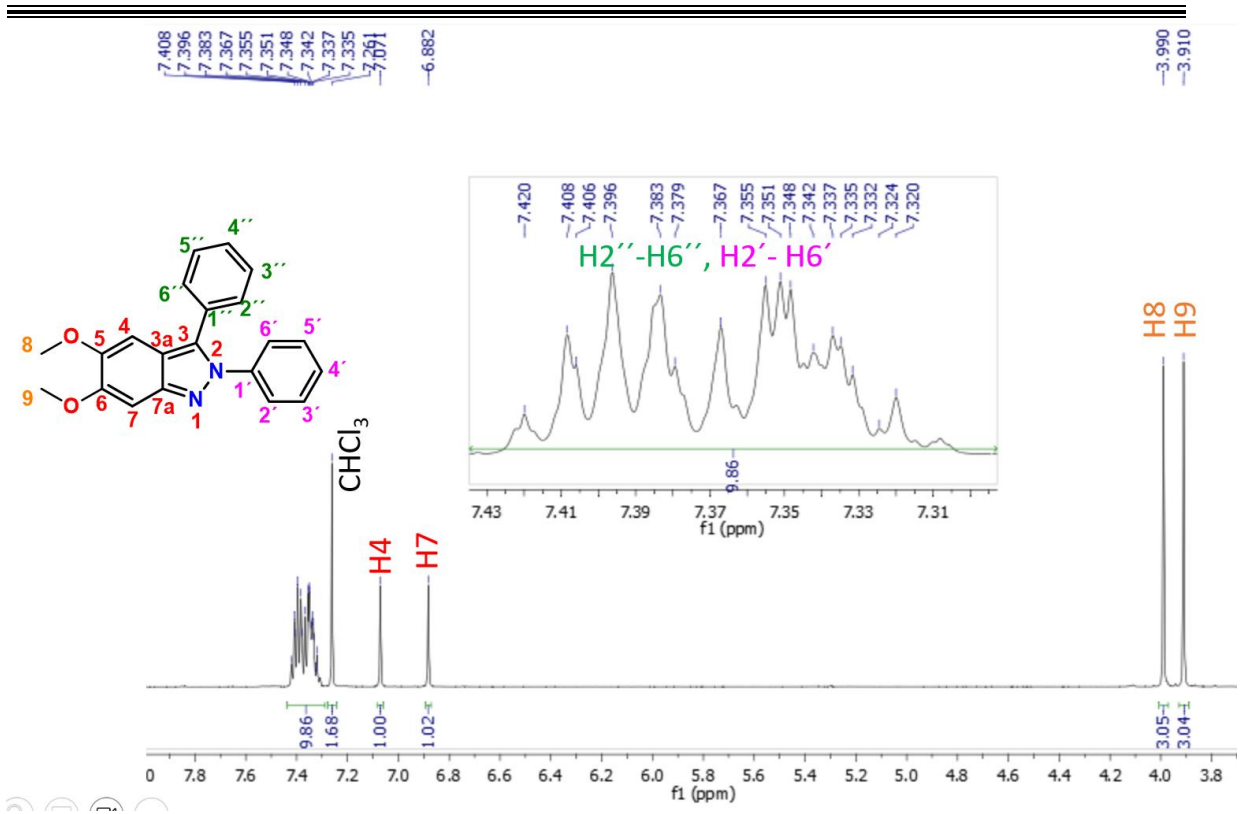


Figura 34. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto YPC-1.

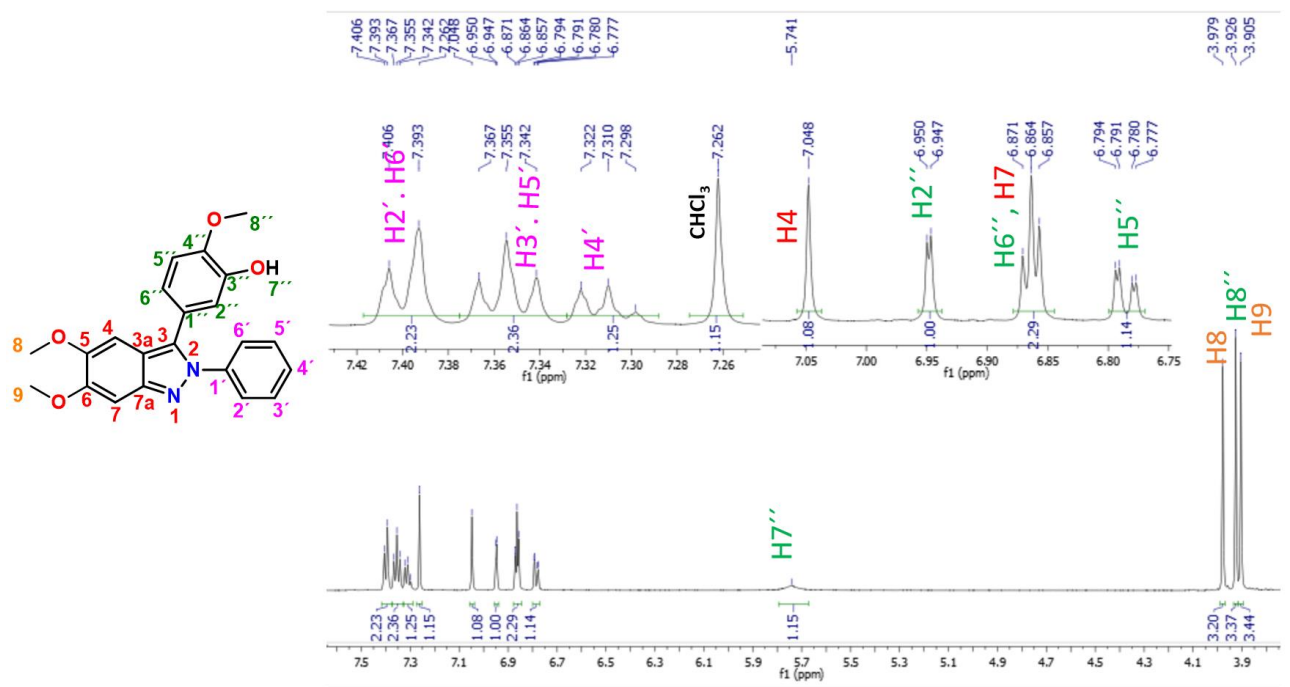


Figura 35. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto YPC-2.

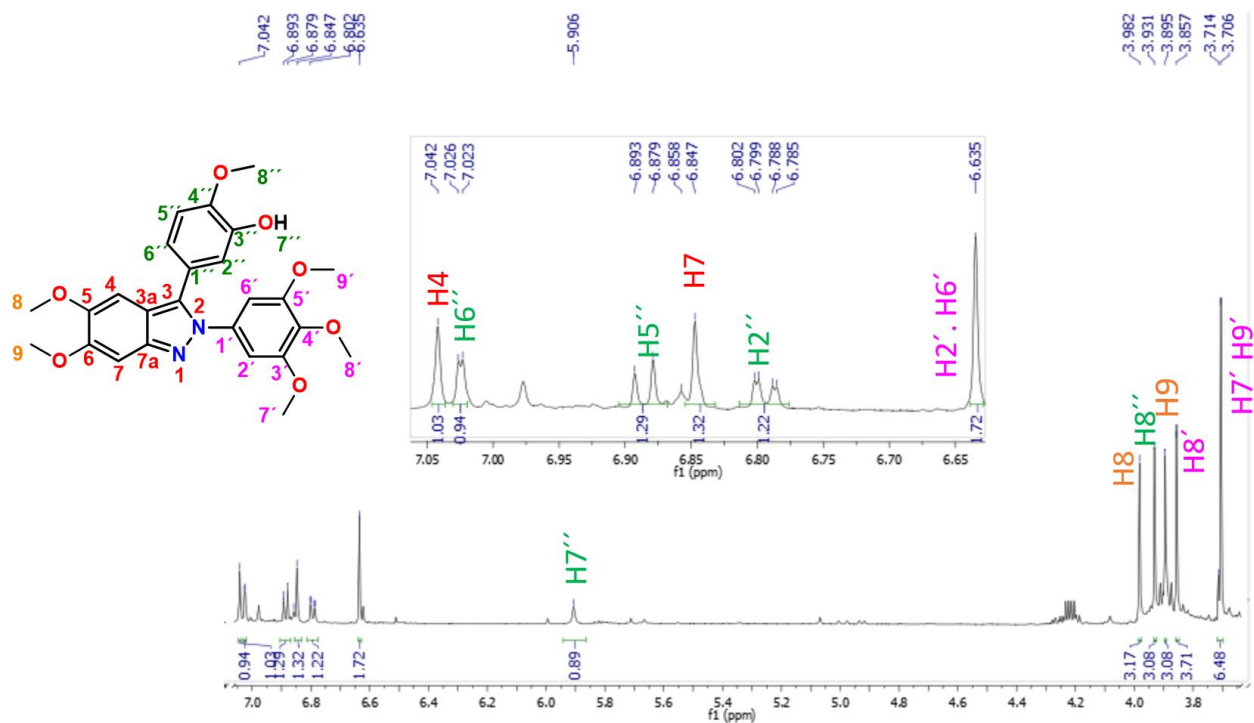


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-3.

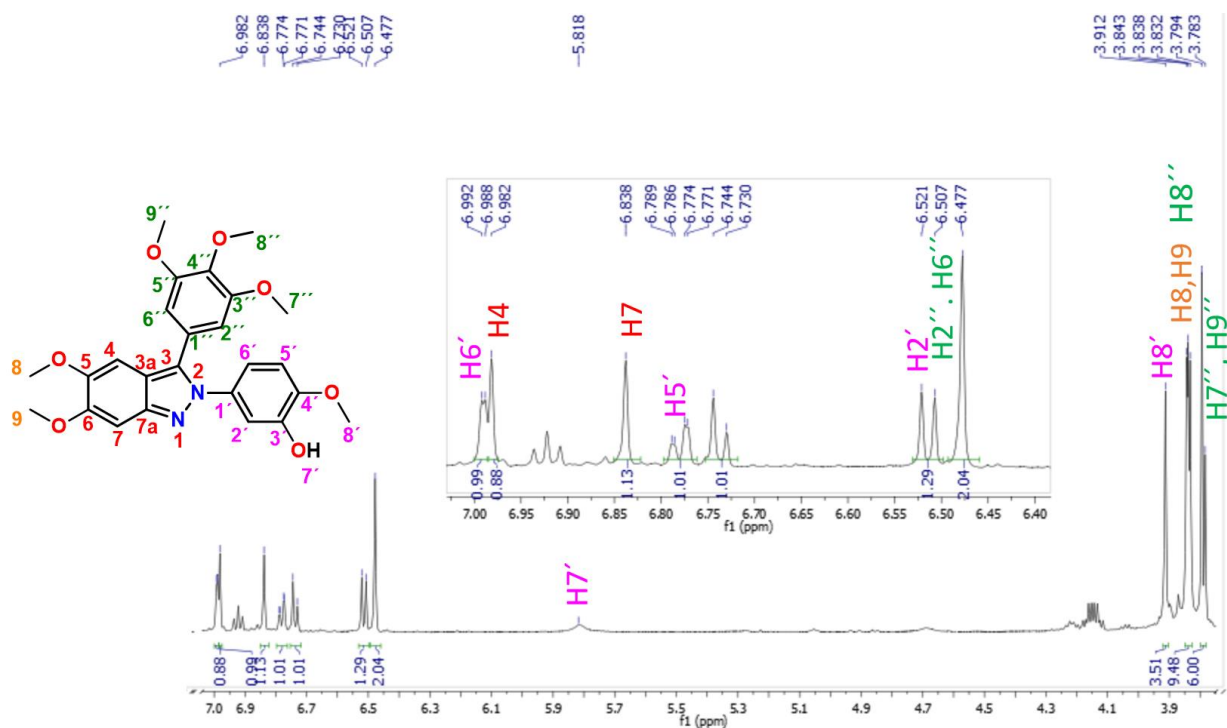


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-4.

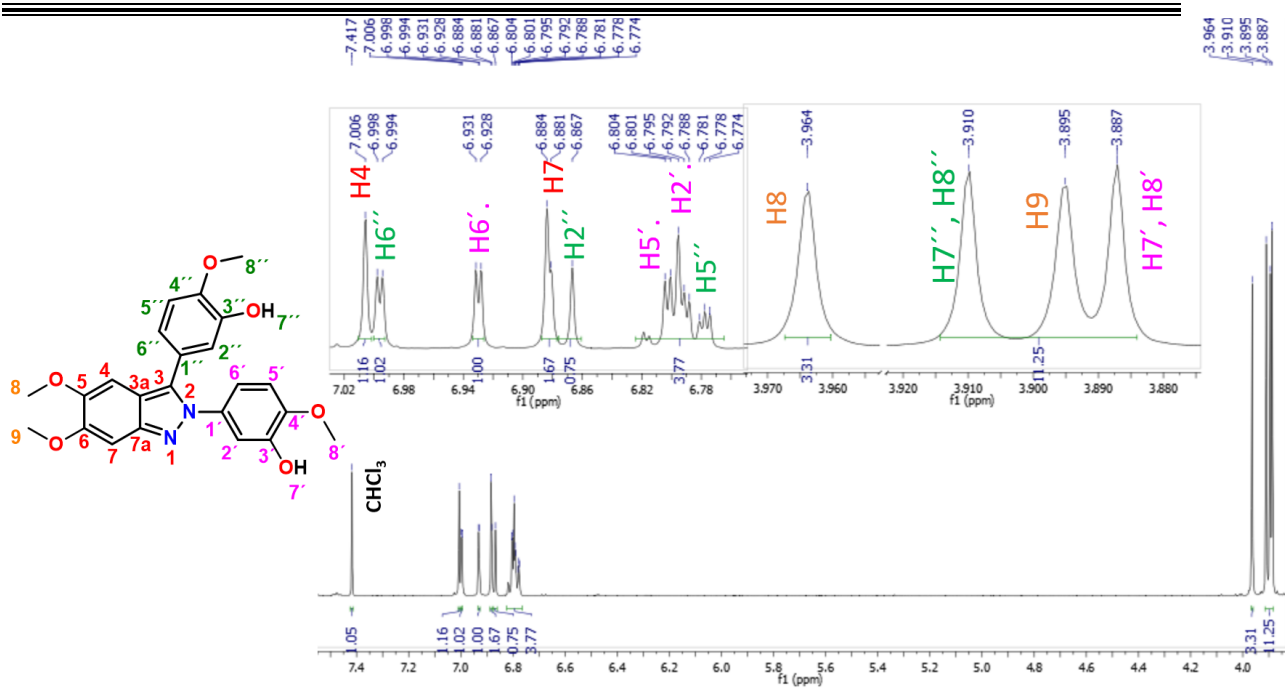


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) del compuesto YPC-5.