



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Análisis *in silico* e *in vitro* del efecto citotóxico de derivados del
ácido gálico en células de cáncer cervicouterino HeLa”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

NINFA YARET NOLASCO QUINTANA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2022

"Me enseñaron que el camino del progreso no es ni rápido ni fácil".

Marie Curie

- La realización de este trabajo fue posible gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACyT** por otorgar la beca de doctorado (591851/305328), así como al apoyo financiero parcial de CONACyT para el proyecto de Ciencia Básica (240801) y el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (315896).



- Este proyecto se realizó en el laboratorio 321 de productos naturales, en el centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, así como los análisis espectroscópicos y de masas de los compuestos se realizaron en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM), lo anterior bajo la dirección de la dra. Laura Patricia Alvarez Berber.



- La parte teórica de este proyecto se realizó bajo la dirección y en colaboración con Dr. Rodrigo Said Razo Hernández del Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.



- Las evaluaciones *in vitro* se realizaron en el laboratorio 7 de la facultad de farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la dra. Leticia González Maya.



El trabajo generó la siguiente publicación:

Nolasco-Quintana NY, González-Maya L, Razo-Hernández RS, Alvarez L. Exploring the Gallic and Cinnamic Acids Chimeric Derivatives as Anticancer Agents over HeLa Cell Line: An in silico and in vitro Study. Mol Inform. 2022 Sep 5:e2200016. doi: 10.1002/minf.202200016. Epub ahead of print. PMID: 36065495.

Y se presentó:

- En la 16a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (2021)

En donde se obtuvo el segundo lugar nivel doctorado en el concurso de trabajos presentados en cartel por socios estudiantes de la AMIPRONAT.

El jurado quedó integrado de la siguiente manera:

Jurado	Nombre	Adscripción
Presidente	Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez	CIQ-UAEM
Secretario	Dr. Rodrigo Said Razo Hernández	CIDC-UAEM
Vocal	Dr. Juan José Acevedo Fernández	FM-UAEM
Vocal	Dr. José Luis Medina Franco	FQ-UNAM
Vocal	Dr. Enrique Salas Vidal	IBT-UNAM
Suplente	Dra. María Angélica Santana Calderón	CIDC-UAEM
Suplente	Dra. Laura Patricia Alvarez Berber	CIQ-UAEM

:



Instituto de Biotecnología
UNAM

DEDICATORIAS:

A mis padres Lilia y Fortino, mi amor siempre

A mi hermano Erwin y mi cuñada Citlalli

A mis sobrinos Kevin, Karen y Fabricio

A mis tíos Yola y Elmer

A mi compañero de aventuras Jorge

Al Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia†

Siembro laureles que no veré crecer, porque disfruto la sombra de los que no sembré.

Alfredo Martínez

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Laura Alvarez, por aceptarme en su laboratorio sin objeción alguna, siempre la he admirado y el poder formar parte de su laboratorio ha sido un orgullo para mí. Gracias por las veces que con paciencia compartió conmigo sus conocimientos, usted siempre me inspira y me motiva.

A la maestra Silvia Marquina, gracias por su enseñanza y guía cuando llegue al laboratorio.

A la Dra. Mayra Antúnez, gracias por compartir sus conocimientos y sugerencias alrededor de este proyecto.

A la Dra. Leticia González Maya, por su guía, el apoyo y los conocimientos compartidos durante las evaluaciones biológicas.

A mi comité tutorial:

Especialmente al Dr. Rodrigo Razo, por su inmenso apoyo en la parte teórica de este proyecto, muchas gracias por la paciencia que tuvo al compartir sus conocimientos y por la dedicación que puso en este trabajo.

Dra. Angelica Santana, gracias por todas las observaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Dra. Yolanda Ríos, gracias por todas las sugerencias y comentarios, me impulsaron a siempre querer hacer mejor las cosas.

Gracias al jurado revisor de tesis por sus observaciones tan oportunas y enriquecedoras; Dr. Juan José Acevedo, Dr. José Luis Medina Franco y Dr. Enrique Salas Vidal.

Muchas Gracias a mi querida amiga y maestra Mari, desde mi día uno en el lab estuvo dispuesta a ayudarme y siempre con su sonrisa tan característica, te admiro y te quiero.

A Isra, gracias por sus enseñanzas y comentarios durante este trayecto, así como por esta bonita amistad de más de 10 años.

A Gaby y Ene por su apoyo moral, el cariño y la paciencia que me tienen, las quiero.

A mis chuchinas hermosas Kris y May, las adoro y admiro.

A mis amigas Cynthia, Lil, Dian, Ruby, Fanny, Pau y Shaki; por el cariño y motivación que siempre me brindan.

A mis amigos y compañeros del Lab 321 Ara, Fidel, Diana y Juan, gracias por su apoyo durante este proyecto.

A mis amigos y compañeros Vianey e Ihtiel, gracias por su cariño y motivación, me gustó trabajar con ustedes.

A Susy Picazo, gracias por siempre creer en mí, por su cariño y apoyo a través de los años, la quiero.

A mi familia, muchas gracias por su apoyo y amor incondicional, han sido el motor que me impulsa hacia adelante, con usted lo tengo todo.

A Jorge, por su paciencia y cariño, gracias por todo lo que haces por mí, te quiero.

Mil gracias al Dr. Jesús Santa-Olalla Tapiat, él fue la primer persona que me brindó la oportunidad de trabajar en un laboratorio de investigación, mis buenas prácticas en cultivo celular son gracias a él. Gracias por siempre hacer que me supere e intente ser mejor cada día. Siempre estaré agradecida por el apoyo que le brindó a mi familia y a mí. Siempre estará en mi corazón.

Gracias a todas las personas involucradas a lo largo de esta aventura.

A las personas que le ponen música a mi vida y me han enseñado que el trabajo es la suerte.

A CONACyT por el apoyo económico otorgado.

ÍNDICE

Lista de Figuras	xi
Lista de tablas.....	xii
Lista de espectros	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN.....	2
Referencias	8
CAPÍTULO I Antecedentes	10
1.3.1 Variación molecular (modificaciones moleculares).....	36
1.3.2 Diseño racional de fármacos asistido por computadora.....	36
1.3.2.1 QSAR	38
1.3.2.2 Acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	40
CAPÍTULO II	51
Análisis QSAR y diseño de nuevos derivados de ácido gálico (AG).....	51
2.1 DETALLES COMPUTACIONALES	52
2.1.1 Búsqueda de moléculas y diseño molecular.....	52
2.1.2 Cálculo de descriptores moleculares	53
Tabla 2.1 Descriptores moleculares usados durante la construcción del modelo QSAR ..	54
2.1.3 Generación del modelo QSAR.....	55
2.1.4 Validación del modelo QSAR	56
2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
2.2.1 Modelo QSAR	57
2.2.2 Diseño de derivados quiméricos gálicos y cinámicos basado en el ligando N1-N9.....	68
2.3 CONCLUSIONES	71
2.4 REFERENCIAS.....	73
2.5 ANEXOS	75
CAPÍTULO III	95
Síntesis y purificación de nuevos derivados de AG (N1-N9).....	95
3.1 Métodos químicos.....	96
3.1.1 Método general.....	96
3.1.2 Síntesis general de los derivados del ácido gálico	97
3.1.2.1 Procedimiento general para la preparación de los ésteres N1, N2 y N5-N7	97
3.1.2.2. Procedimiento general para la semisíntesis de los compuestos N3 y N4.	98
3.1.3. Estabilidad de los compuestos N1-N9.....	99

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
3.2.1.1. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de cinamilo (N1)	100
3.2.1.2. 3,4-Dimetoxibenzoato de cinamilo (N2)	100
3.2.1.3. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N5)	101
3.2.1.4. 3,4-Dimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N6)	102
3.2.1.5. Cinamato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N7)	102
3.2.1.6. 3,4,5-Trimetoxicinamato de cinamilo (N8)	103
3.2.1.7. 3,4,5-Trimetoxicinamato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N9)	103
3.2.1.8 3,4,5-Trimetoxibenzoato de etilo (N3)	104
3.2.1.9 3,4-Dimetoxibenzoato de etilo (N4)	104
3.2.2 Estabilidad de los derivados del AG	105
3.3 CONCLUSIONES	106
3.4 REFERENCIAS	107
3.5 ANEXOS	108
CAPÍTULO IV	126
Actividad citotóxica <i>in vitro</i> y análisis <i>in silico</i> del mecanismo de acción de los derivados N1-N9	126
4.1 DETALLES EXPERIMENTALES	127
4.1.1 Cultivo celular	127
4.1.2 Ensayo de viabilidad celular	127
4.1.3 Análisis estadístico	128
4.2 Detalles computacionales	128
4.2.1 Acoplamiento (<i>docking</i>) molecular sobre tubulina	128
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
4.3.1 Evaluación biológica y SAR	130
4.3.2 Acoplamiento Molecular sobre tubulina	136
4.4 CONCLUSIONES	146
4.5 REFERENCIAS	148
4.6 ANEXOS	149

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Fármacos empleados en el tratamiento del cáncer cervicouterino.	2
Figura 1.1. Epidemiología del cáncer durante el 2020.	12
Figura 1.3. Fases de la carcinogénesis.	15
Figura 1.4. Fases del ciclo celular.	16
Figura 1.5. Características moléculas del cáncer.	17
Figura 1.6. Apoptosis vía extrínseca e intrínseca.	21
Figura 1.7. Organización de las subunidades α y β de la tubulina en un protofilamento	23
Figura 1.8. Dinámica de la polimerización y despolimerización del microtúbulo	24
Figura 1.9. Sitios de unión de ligandos exógenos en la tubulina.	29
Figura 1.10. Clasificación de los ligandos exógenos de tubulina.....	30
Figura 1.11. División del sitio de unión de la colchicina. AECC, 2018.....	32
Figura 1.12. Estructura del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (Ácido gálico)	32
Figura 1.13. Derivados del ácido gálico: Esteres alquílicos.	34
Figura 1.14. Efecto citotóxico de la combinación del AG y Paclitaxel (PTX) en cáncer de ovario ..	35
Figura 2.1. Estructura de los compuestos aromáticos utilizados en los modelos QSAR	58
Figura 2.2. Habilidad predictiva del modelo QSAR (Log IC _{50Pred} VS. Log IC _{50Exp}	61
Figura 2.3. Estrategia de diseño de nuevos derivados de AG.	69
Figura 2.4. Análogos de galato de arilo sintetizados en base a los resultados del modelo QSAR (ec 1).	70
Figura 3.1. Estabilidad del compuesto N1 en condiciones de cultivo celular.	105
Figura 4.1. Estructura cristalina del complejo colchicina-tubulina (PDB:5XIW) y del complejo heterocíclico pirimidina-tubulina (PDB:6BR1).	130
Figura 4.2. Representaciones en 2D de moléculas que interactúan con la tubulina y que presentan en su estructura el grupo trimetoxi fenilo.	133
Figura 4.3. Alineamiento estructural de N1, N5 y N6 con compuestos que se unen a la tubulina en el sitio de la colchicina.	135
Figura 4.4. Modo de unión de N1-N9 con la tubulina (PDB:5XIW). A) Modo de unión de N5, N6 y N9 con la tubulina.....	137
Figura 4.5. Modo de unión de N1, N5-N9 con la tubulina (PDB:6BR1).	141
Figura 4.6. Modos de unión de N5 con el cristal de tubulina 6BR1.	145
Figura 4.7. Modos de unión de N6 con el cristal de tubulina.6BR1	146

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de las moléculas de acuerdo con la línea celular donde fueron evaluadas.....	6
Tabla 2.1 Descriptores moleculares usados durante la construcción del modelo QSAR.	54
Tabla 2.2. Valores de los descriptores moleculares y de las actividades citotóxicas predichas de los derivados N1-N9.....	71
Tabla 4.1 Valores correspondientes a las actividades citotóxicas experimentales y la predichas de los derivados N1-N9.	132
Tabla 4.2. Valores de energía de interacción (kcal/mol) obtenidos por el <i>docking</i> molecular en diferentes cristales de tubulina.	139

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 (MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de cinamilo (N1).	108
Espectro 2. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 (MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de cinamilo (N1)	109
Espectro 3. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de cinamilo (N2)	110
Espectro 4. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de cinamilo (N2)	111
Espectro 5. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etilo (N3).....	112
Espectro 6. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125.77 MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etilo (N3)...	113
Espectro 7. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de etilo (N4)	114
Espectro 8. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de etilo (N4)	115
Espectro 9. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 400 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-trimetoxibenzoato (N5).....	116
Espectro 10. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-trimetoxibenzoato (N5).....	117
Espectro 11. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4-dimetoxibenzoato (N6).	118
Espectro 12. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125.77 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4-dimetoxibenzoato (N6).....	119
Espectro 13. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil cinamato (N7).....	120
Espectro 14. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125.77 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil cinamato (N7)..	121
Espectro 15. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 3,4,5-trimetoxicinamato de cinamilo (N8). 122	
Espectro 16. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125.77 MHz) de 3,4,5-trimetoxicinamato de cinamilo (N8).	123
Espectro 17. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-Trimetoxicinamato (N9).....	124
Espectro 18. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125.77 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-Trimetoxicinamato (N9).....	125

Abreviaturas

1D Una dimensión

2D Dos dimensiones

Å Amstrong

ABTS Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico-6

°C Grados centígrados

¹H Protón

¹³C Carbono 13

AcOEt Acetato de etilo

ADN Ácido desoxirribonucleico

AG Ácido gálico

ASM Análisis de Similitud Molecular

CA-4 Combretastatina A- 4

CCF Cromatografía en capa fina

CC Cromatografía en columna

CH₂Cl₂ Diclorometano

CI₅₀ Concentración Inhibitoria media

d Doblete

dd doble de dobles

DCM Diclorometano

DMSO Dimetil sulfóxido

DPPH 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

EM Espectrometría de masas

EtOH Etanol

FRAP del inglés *Ferric ion Reducing Antioxidant Power*

g Gramos

GDP Guanosín difosfato
GTP Guanosín trifosfato
H Hora
HaCaT Línea celular de queratinocitos
HB del inglés hydrogen bonding
HeLa Línea celular de cáncer cervicouterino
kDa Kilo Dalton
M Molaridad
mg Miligramos
mM Mili molar
μM Micro molar
MeOH Metanol
MHz Mega Hertz
MTT 3-(4, 5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio bromidio
nm Nanómetro
OMS Organización Mundial de la Salud
PDB *Protein Data Bank*
PC-3 Línea celular de carcinoma de próstata humano
ppm Partes por millón
QSAR *Quantitative structure-activity relationship*
RMN Resonancia Magnética Nuclear
rpm Revoluciones por minuto
THF Tetrahidrofurano
TOPO II Topoisomerasa II
Tx Taxol

RESUMEN

Durante los últimos años y de acuerdo con los informes generados en el 2020, el cáncer se ha posicionado como una de las enfermedades con mayor número de muertes. Resultan relevantes el cáncer de mama y el cervicouterino, como los de mayor incidencia asociados a la población femenina. En cuanto al cáncer cervicouterino, la tasa de recuperación es baja, a pesar del buen manejo de la enfermedad, es por ello por lo que resulta relevante el estudio asociado a su tratamiento. En la actualidad existen más de 300 fármacos oncológicos de los cuales cinco se emplean de manera individual en el tratamiento del cáncer cervicouterino, mientras que cuatro se usan de manera combinada.

A través de diversas investigaciones, se ha observado que una amplia variedad de compuestos fenólicos de origen vegetal ha presentado efectos citotóxicos *in vitro* en diferentes líneas celulares de cáncer, por lo que muchos productos naturales forman parte de las nuevas propuestas terapéuticas contra esta enfermedad. Es importante destacar, que las principales limitaciones del uso de productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos es su mínima presencia en la naturaleza y la difícil síntesis en el laboratorio, esto último debido a sus estructuras complejas. Dentro de los productos naturales destaca el ácido gálico (AG) por su reconocida actividad anticancerígena al impedir la proliferación celular.

En el presente trabajo se generó un modelo de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), empleando 134 compuestos fenólicos con actividad citotóxica sobre la línea celular HeLa para generar un modelo QSAR descriptivo ($R^2 = 0.76$)

y predictivo ($Q^2 = 0.69$ y $Q_{ext}^2 = 0.62$). Las características estructurales, electrónicas, estéricas e hidrofóbicas de los compuestos se representan como diferentes descriptores moleculares. A partir de este modelo, se diseñaron y sintetizaron nueve derivados de ácido gálico (**N1-N9**). Los nueve compuestos sintetizados fueron purificados mediante columnas cromatográficas y elucidados mediante RMN. Una vez puros, se evaluó su actividad citotóxica en las líneas celulares HeLa (cáncer cervicouterino) y HaCaT (no cancerígenas). Se pudo observar que los derivados 3,4,5-Trimetoxibenzoato de cinamilo (**N1**, $IC_{50Pred} = 6.41 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa} = 11.29 \pm 1.70 \mu M$), 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**N5**, $IC_{50Pred} = 10.19 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa} = 9.45 \pm 2.46 \mu M$), 3,4-dimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**N6**, $IC_{50Pred} = 12.13 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa} = 7.26 \pm 0.68 \mu M$) y 3,4,5-Trimetoxicinamato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**N9**, $IC_{50Pred} = 28.99 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa} = 11.95 \pm 3.22 \mu M$) fueron los más activos en la línea celular HeLa, así como también se estableció que nuestros compuestos no afectan la viabilidad de las células no cancerígenas (HaCaT).

Finalmente, se evaluó un posible mecanismo de acción mediante alineamiento estructural y acoplamiento molecular, analizando el modo de unión de estos compuestos en el sitio de unión a la colchicina en la tubulina. Los resultados del alineamiento estructural mostraron una sobreposición de **N1**, **N5** y **N6** respecto a dos moléculas ((2E)-1-(3', 4', 5'-trimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona) y 1-metil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-(4etoxifenil)-1H-pirazol) que reportan su unión a la tubulina en el sitio de la colchicina. Mientras que, los resultados del *docking* muestran una mejor interacción de los derivados **N1**, **N5**, **N6** y **N9** al sitio

de unión de la colchicina en la tubulina de los cristales 5XIW y 6BRF1. Concluyendo que los derivados **N1**, **N5**, **N6** y **N9** cuentan con actividad citotóxica en la línea celular HeLa y que el posible mecanismo de acción es la unión a tubulina, así como también estos derivados pueden dar pie a nuevas moléculas con mejor actividad citotóxica, además que los nueve derivados son el resultado de una semi-síntesis económica y poco compleja.

ABSTRACT

In recent years and according to reports generated in 2020, cancer has positioned itself as one of the diseases with the highest number of deaths. Breast and cervical cancer are the most common cancers in the female population. As for cervical cancer, the recovery rate is low, despite good management of the disease, which is why the study associated with its treatment is relevant. There are currently more than 300 cancer drugs, of which five are used individually in the treatment of cervical cancer, while four are used in combination.

Research has shown that a wide variety of plant-derived phenolic compounds have shown in vitro cytotoxic effects on different cancer cell lines, so many natural products are part of the new therapeutic approaches against this disease. It is important to note that the main limitations of the use of natural products in the development of new drugs are their minimal presence in nature and their difficult synthesis in the laboratory, the latter due to their complex structures. Among the natural products, gallic acid (GA) stands out for its recognized anti-cancer activity by preventing cell proliferation.

In the present work, a quantitative structure-activity relationship (QSAR) model was generated using 134 phenolic compounds with cytotoxic activity on the HeLa cell line to generate a descriptive ($R^2 = 0.76$) and predictive ($Q^2 = 0.69$ and $Q_{ext}^2 = 0.62$) QSAR model. The structural, electronic, steric, and hydrophobic features of the compounds are represented as different molecular descriptors. From this model, nine gallic acid derivatives (**N1-N9**) were designed and synthesised. The nine synthesised compounds were purified by chromatographics

columns and eluted by NMR. Once purified, their cytotoxic activity was evaluated in HeLa (cervical cancer) and HaCaT (non-cancerous) cell lines. It was observed that the derivatives cinnamyl 3,4,5-trimethoxybenzoate (**N1**, $IC_{50Pred}= 6.41 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa}= 11.29 \pm 1.70 \mu M$), 3,4,4,5-trimethoxybenzyl 3,4,5-trimethoxybenzoate (**N5**, $IC_{50Pred}= 10.19 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa}= 9.45 \pm 2.46 \mu M$), 3,4,5-trimethoxybenzyl 3,4,5-dimethoxybenzoate (**N6**, $IC_{50Pred}= 12.13 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa}= 7.26 \pm 0.68 \mu M$) and 3,4,5-trimethoxybenzyl 3,4,5-trimethoxycinnamate (**N9**, $IC_{50Pred}= 28.99 \mu M$, $IC_{50ExpHeLa}= 11.95 \pm 3.22 \mu M$) were the most active in the HeLa cell line, as well as establishing that our compounds do not affect the viability of non-cancer cells (HaCaT).

Finally, a possible mechanism of action was evaluated by structural alignment and molecular docking, analyzing the binding mode of these compounds at the colchicine binding site on tubulin. Structural alignment results showed an overlap of **N1**, **N5** and **N6** concerning two molecules ((2E)-1-(3', 4', 5'-trimethoxyphenyl)-3-(2-naphthyl)-2-propen-1-one) and 1-methyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-(4-ethoxyphenyl)-1H-pyrazole) that report binding to tubulin in the colchicine domain. Whereas, docking results show an enhanced interaction of the **N1**, **N5**, **N6** and **N9** derivatives to the colchicine binding site on tubulin in the 5XIW and 6BRF1 crystals. It is concluded that the **N1**, **N5**, **N6** and **N9** derivatives have cytotoxic activity in the HeLa cell line and that the possible mechanism of action is tubulin binding, as well as that these derivatives may give rise to new molecules with improved cytotoxic activity, and that the nine derivatives are the result of an inexpensive and not very complex semi-synthesis.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el cáncer se ha posicionado como una de las patologías con mayor número de muertes en el mundo, esto de acuerdo con los informes generados por el Observatorio Mundial del Cáncer.¹ Destacando el cáncer de mama y cervicouterino como los de mayor incidencia asociados a la población femenina, siendo el cervicouterino el que presenta una mayor mortalidad. En el caso del cáncer de mama, aproximadamente 45 fármacos son empleados en su tratamiento, algunos de estos son paclitaxel, doxorubicina, 5-Fluoruracilo, tamoxifen, docetaxel, etc.² Mientras que, en el caso del cáncer cervicouterino existen solo cinco fármacos (bevacizumab, bleomicina, topotecan, pembrolizumab y tisotumab vedotin) que son empleados de manera individual para su tratamiento y cuatro (carboplatino-taxol y gemcitabina-cistaplatino) que se usan de forma combinada.² Esto nos lleva a la búsqueda continua de nuevos compuestos que nos permitan combatir este tipo de cáncer de una mejor manera, dando a los pacientes una mayor esperanza de supervivencia.

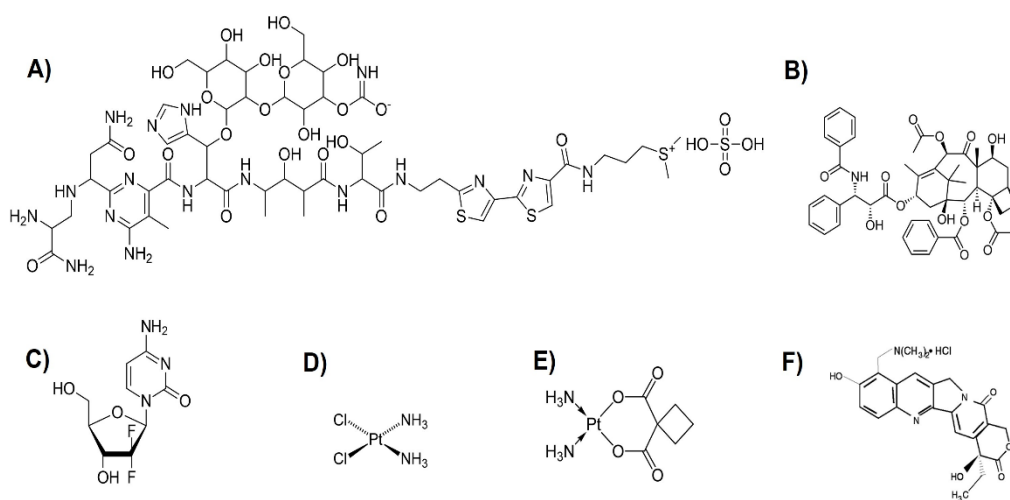


Figura I. Fármacos empleados en el tratamiento del cáncer cervicouterino.

A) Bleomicina, B) Taxol, C) Gemcitabina, D) Cisplatino, E) Carboplatino y F) Topotecan

Los productos naturales cuentan con una amplia gama de bioactividades en diferentes organismos; a pesar de los retos que implican su purificación, sus bajos rendimientos y su elucidación, muchos de ellos forman parte de las nuevas propuestas terapéuticas contra el cáncer. Cabe destacar que estas moléculas pueden presentar una eficacia o propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción subóptimas, esto conlleva a realizar modificaciones químicas, generando análogos, por lo tanto, los productos naturales también son utilizados como punto de partida para el diseño de nuevos fármacos.³

Entre los productos naturales se encuentran los polifenoles (epigallocatequina-3-galato, combretastatina, resveratrol, quercetina, etc.), que son micronutrientes abundantes en nuestra dieta, y son constituyentes de frutas, verduras, legumbres secas y bebidas, como el té, el café o el vino.⁴ Se pueden distinguir dos clases de ácidos fenólicos: los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico, que tienen numerosas actividades biológicas.

El ácido gálico (AG) o ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico, es un compuesto natural, miembro de los ácidos hidroxibenzoicos y se encuentra en las nueces, el zumaque, la corteza de roble, las hojas de té, el té verde, las cáscaras de manzana, las uvas y el vino; se obtiene principalmente por la hidrólisis de los taninos⁵. Se ha descrito que el ácido gálico y sus derivados se han asociado a diversas actividades biológicas, como antioxidante,⁶ antifúngico,⁷ antibacteriano,^{8,9} antiviral,¹⁰ antiherpético,¹¹ antiproliferativo,¹²⁻¹⁴ quimiopreventivo,¹⁵ quimiosensibilizador,¹⁶ y antiinflamatorio.^{15,17} También inhiben selectivamente la

proliferación, la metástasis y los procesos antiapoptóticos mediante la regulación de la vía dependiente de las mitocondrias^{14,18-26} y al interferir con la dinámica de los microtúbulos en líneas celulares de cáncer como PC3, Hep 3B²⁷ y HeLa.²⁸ La ventaja más importante del AG y sus derivados es que pueden inducir selectivamente la apoptosis a las células cancerosas sin afectar a las células normales.^{29,30} Sus actividades contra el cáncer convierten a este tipo de compuestos en importantes biomoléculas para usos terapéuticos.

Por otro lado, el ácido cinámico, incluso con baja toxicidad, tiene un efecto citostático sobre las células de glioblastoma, melanoma, cáncer de próstata y pulmón. En el caso del melanoma, se produce una disminución de la invasión de las células malignas.³¹ Otros efectos biológicos del ácido cinámico y sus derivados son antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios,³² antidiabéticos³³ y neuroprotectores.³⁴

Una herramienta de gran importancia en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas, es el diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC), que consiste en utilizar procesos computacionales para relacionar la actividad de un compuesto con su estructura química.³⁵ Las metodologías computacionales, son primordiales en la organización de datos, interpretación de resultados, generar y probar hipótesis, filtrado de base de datos y diseño de experimentos.³⁶ Lo anterior, debido a que contribuyen en la generación de bases de datos que contienen información química, biológica y estructural de los productos naturales, que pueden ser empleadas para elucidar estructuras, actividades de interés,

similitudes estructurales (2D y 3D), dianas biológicas, mecanismos de acción, perfiles ADME y toxicológicos. Así como también facilitan el diseño de la *síntesis de novo*, incluso ayudan en la identificación de productos naturales que podrían interferir en los ensayos biológicos.^{36,37}

Una de sus estrategias es el diseño de fármacos basado en ligandos (**LBDD** del inglés *Ligand-Based Drug Design*), es decir, se analizan estructuras químicas con actividad biológica para encontrar huellas estructurales que sean clave para su actividad biológica. Este tipo de análisis se realiza a través de las técnicas de modelado del farmacóforo, cribado virtual basado en la similitud molecular y estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (**QSAR** del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Este tipo de análisis representa una de las estrategias más utilizadas para lograr el diseño racional de fármacos. En concreto, el desarrollo de un modelo QSAR permite establecer una relación matemática entre la actividad biológica y las características fisicoquímicas o estructurales, definidas por descriptores moleculares, de las moléculas analizadas.³⁸ Existen reportes de análisis de tipo QSAR que han permitido optimizar diferentes productos naturales, para obtener compuestos más potentes de tipo antipalúdicos,³⁹ herbicidas,⁴⁰ anticancerígenos.^{41,42}

El diseño de nuestros derivados de AG surgió de la premisa de que un amplio grupo de moléculas con actividad citotóxica tienen motivos galoilo en sus estructuras. Es así, como las importantes propiedades biológicas del AG y sus congéneres, nos animaron a combinar el motivo galoilo con otros sustituyentes

fenólicos relacionados, en una única molécula, como una nueva clase de análogos sintéticos del galato de arilo.

En este trabajo, realizamos una búsqueda en la literatura de AG y otros derivados fenólicos que informan de un efecto citotóxico, las palabras empleadas en el buscador de PubMed fueron: *gallic acid derivatives*, *phenolic derivatives*, *phenolic acids*, *phenolic acid derivatives*, *benzoic acid derivatives*, *ferulic acid derivatives*, *cinnamic acid derivatives*, *coumaric acid derivatives*, *caffeic acid derivatives*, *protocatechuic acid derivatives*, *4-hydroibenzoic acid derivatives* y *chalcones*; seguido de las palabras *cancer* y *cytotoxicity*. Se realizó una clasificación de los compuestos encontrados, tomando en cuenta el método empleado y el tiempo de incubación para la evaluación del efecto citotóxico. Se determinó que el método del MTT y 72 h de incubación fueron las características más comunes. Seguido de esto, se agrupó a las moléculas de acuerdo con la línea celular en la cual fueron evaluadas y se obtuvo la tabla I.

Tabla I. Clasificación de las moléculas de acuerdo con la línea celular donde fueron evaluadas

Línea celular	Derivados de AG	Derivados fenólicos	Chalconas	Derivados de ácidos fenólicos	Total de moléculas
MCF-7	21	38	127	117	303
HeLa	11	8	110	41	170
A549	18	24	79	41	162
PC3	8	3	117	2	130
Hep-G2	17	34	37	24	112
MDA-MB321	5	1	67	12	85
HL-60	5	14	40	18	77
DU-145	14	5	27	0	46

En la columna de los derivados de ácido fenólicos (tabla I) incluimos a las moléculas que resultaron de la búsqueda correspondiente a *phenolic acids*, *phenolic acid derivatives*, *benzoic acid derivatives*, *ferulic acid derivatives*, *cinnamic acid derivatives*, *coumaric acid derivatives*, *caffeic acid derivatives*, *protocatechuic acid derivatives* y *4-hydroibenzoic acid derivatives*. Para nuestro proyecto se decidió continuar con el análisis de los compuestos evaluados en la línea celular HeLa correspondiente a cáncer cervicouterino, debido a que es el más agresivo en la población femenina.¹ Se descartaron 30 compuestos debido a que presentaban IC₅₀ debajo del rango micromolar, lo que aumenta sus efectos secundarios. Esto nos permitió trabajar con 140 estructuras con anillos aromáticos y a través de la información proporcionada por QSAR nos ayudó a predecir la actividad citotóxica de los nuevos análogos de galato de arilo propuestos, en células de cáncer cervicouterino (HeLa). Basándonos en nuestro modelo QSAR, se llevó a cabo la síntesis de nueve análogos de galato de arilo (**N1-N9**) y se evaluó su actividad citotóxica contra la línea celular HeLa. De ellos, el 3,4-dimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**N6**) fue el más activo con un IC₅₀ experimental de $7.26 \pm 0.68 \mu\text{M}$. Finalmente, se realizó un *docking* molecular de estos compuestos sobre la tubulina, para evaluar su capacidad de actuar como inhibidores de su polimerización.

REFERENCIAS

1. IARC. CANCER TODAY [Internet]. 2020. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group
2. National Cancer Institute [NCI] [Internet]. 2021. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/>
3. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Taskforce TINPS, Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20:200–16.
4. Nourah A, Reda M, Abdullah M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2020;204:112609. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>
5. Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li Z, Taketa T. Selective Induction of Cell Death in Cancer by Gallic Acid. Vol. 18, *Biol Pharm. Bull.* 1995.
6. Aruoma OI, Murcia A, Butler J, Halliwell B. Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *J Agric Food Chem.* 1993;41(11):1880–5.
7. Fujita KI, Kubo I. Antifungal activity of octyl gallate. *Int J Food Microbiol.* 2002;79(3):193–201.
8. Kubo I, Fujita KI, Nihei KI, Nihei A. Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem.* 2004;52(5):1072–6.
9. Silva IC, Regasini LO, Petr nio MS, Silva DHS, Bolzani VS, Belasque J, et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *J Bacteriol.* 2013;195(1):85–94.
10. Kratz JM, Andrighetti-Fr hner CR, Kolling DJ, Leal PC, Cirne-Santos CC, Yunes RA, et al. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(5):437–42.
11. Savi LA, Leal PC, Vieira TO, Rosso R, Nunes RJ, Yunes RA, et al. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 2005;55(1):66–75.
12. Dodo K, Minato T, Noguchi-Yachide T, Suganuma M, Hashimoto Y. Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. *Bioorganic Med Chem.* 2008;16(17):7975–82.
13. Hsu FL, Chen PS, Chang HT, Chang ST. Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi. *Int Biodeterior Biodegrad* [Internet]. 2009;63(5):543–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.02.005>
14. Locatelli C, Filipin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2012;60:233–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.056>
15. Morais MCC, Luqman S, Kondratyuk TP, Petronio MS, Regasini LO, Silva DHS, et al. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: Possible role in cancer chemoprevention. Vol. 24, *Natural Product Research.* 2010. p. 1758–65.
16. S nchez-Carranza JN, D az JF, Redondo-Horcajo M, Barasoain I, Alvarez L, Lastres P, et al. Gallic acid sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells through an increase in reactive oxygen species and subsequent downregulation of ERK activation. *Oncol Rep.* 2018;39(6):3007–14.
17. Na HJ, Lee G, Oh HY, Jeon KS, Kwon HJ, Ha KS, et al. 4-O-Methylgallic acid suppresses inflammation-associated gene expression by inhibition of redox-based NF- κ B activation. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(10):1597–608.
18. Chandramohan Reddy T, Bharat Reddy D, Aparna A, Arunasree KM, Gupta G, Achari C, et al. Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: Downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF- κ B inactivation. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2012;26(3):396–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.018>
19. Chou YW, Senadi GC, Chen CY, Kuo KK, Lin YT, Wang JJ, et al. Design and synthesis of pyrrolobenzodiazepine-gallic hybrid agents as p53-dependent and-independent apoptogenic signaling in melanoma cells. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2016;109:59–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.039>
20. Jara JA, Castro-Castillo V, Saavedra-Olavarr a J, Peredo L, Pavanni M, Ja a F, et al. Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice. *J Med Chem.* 2014;57(6):2440–54.
21. Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(12):1973–81.
22. Serrano A, Palacios C, Roy G, Cesp n C, Villar ML, Nocito M, et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in

-
- tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys.* 1998;350(1):49–54.
23. Yeh RD, Chen JC, Lai TY, Yang JS, Yu CS, Chiang JH, et al. Gallic acid induces G0/G1 phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Res.* 2011;31(9):2821–32.
 24. Yoon CH, Chung SJ, Lee SW, Park YB, Lee SK, Park MC. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Jt Bone Spine [Internet].* 2013;80(3):274–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.08.010>
 25. Yoshioka K, Kataoka T, Hayashi T, Hasegawa M, Ishi Y, Hibasami H. Induction of apoptosis by gallic acid in human stomach cancer KATO III and colon adenocarcinoma COLO 205 cell lines. *Oncol Rep.* 2000;7(6):1221–3.
 26. You BR, Park WH. Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicol Vitro [Internet].* 2010;24(5):1356–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.009>
 27. Sánchez-Carranza JN, Alvarez L, Marquina-Bahena S, Salas-Vidal E, Cuevas V, Jiménez EW, et al. Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules.* 2017;22(4).
 28. Tan S, Guan X, Grün C, Zhou Z, Schepers U, Nick P. Gallic acid induces mitotic catastrophe and inhibits centrosomal clustering in HeLa cells. *Toxicol Vitro.* 2015 Dec 25;30(1):506–13.
 29. Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y, Yabu Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;204(2):898–904.
 30. Chen HM, Wu YC, Chia YC, Chang FR, Hsu HK, Hsieh YC, et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Lett [Internet].* 2009;286(2):161–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.040>
 31. Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D. Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention. *Int J Cancer.* 1995;62(3):345–50.
 32. Lima GD de A, Rodrigues MP, Mendes TA de O, Moreira GA, Siqueira RP, da Silva AM, et al. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. *Toxicol Vitro [Internet].* 2018;53:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.015>
 33. Adisakwattana S, Pongsuwan J, Wungcharoen C, Yibchok-Anun S. In vitro effects of cinnamic acid derivatives on protein tyrosine phosphatase 1B. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013;28(5):1067–72.
 34. Lan JS, Hou JW, Liu Y, Ding Y, Zhang Y, Li L, et al. Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem [Internet].* 2017;32(1):776–88. Available from: <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256883>
 35. Hopfinger AJ. Computer-Assisted Drug Design. *J Med Chem.* 1985;28(9):1133–9.
 36. Medina-Franco JL, Saldivar-González FI. Cheminformatics to Characterize Pharmacologically Active Natural Products.pdf. *Biomolecules.* 2020;10(1566):1–14.
 37. Chen Y, Kirchmair J. Cheminformatics in Natural Product-based Drug Discovery. *Mol Inform.* 2020;39(2000171):1–16.
 38. Kubinyi H. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) and molecular modelling in cancer research. Vol. 116, *J Cancer Res Clin Oncol.* 1990.
 39. Tiburcio-Ferreira L, Borba JVB, Moreira-Filho JT, Rimoldi A, Horta Andrade C, Maranhão-Costa FT. Qsar-based virtual screening of natural products database for identification of potent antimalarial hits. *Biomolecules.* 2021;11(3):1–12.
 40. Zhang X, Zhu T, Bi X, Yang S, Huang J, Zhou L. Laboratory bioassay, greenhouse experiment and 3D-QSAR studies on berberine analogues: a search for new herbicides based on natural products. *Pest Manag Sci.* 2021;77(4):2054–67.
 41. Maldonado-Santiago M, Santiago Á, Pastor N, Alvarez L, Razo-Hernández RS. Isatin derivatives as DNA minor groove-binding agents: a structural and theoretical study. *Struct Chem.* 2020;31(4):1289–307.
 42. Leyva-Peralta MA, Robles-Zepeda RE, Razo-Hernández RS, Berber LPÁ, Lara KO, Ruiz-Bustos E, et al. Berberine as Source of Antiproliferative Hybrid Compounds: In Vitro Antiproliferative Activity and Quantitative Structure-activity Relationship. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019 Jan 10;19(15):1820–34.

CAPÍTULO I

Antecedentes

1.1 CÁNCER

El cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades, en el que algunas células del cuerpo empiezan a proliferar sin detenerse y se diseminan a los demás tejidos,¹ estas células anormales pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, sobrepasar a las células normales y dificultar que el cuerpo funcione adecuadamente.² Es importante resaltar que diferentes tipos de cáncer se pueden prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco.³ Además de que se conocen más de 100 tipos de cáncer, que de manera general reciben el nombre de los tejidos u órganos en donde se originan.¹

1.1.1 Epidemiología

Con base en las enfermedades crónicas no transmisibles, se puede decir que dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial están las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, enfermedades respiratorias y diabetes con 17.9, 9.0, 3.9 y 1.6 millones de muertes por año respectivamente.^{4,5} Al analizar el comportamiento epidemiológico del cáncer, se presenta una variabilidad dependiendo de las diferentes regiones, países y sexo. A nivel mundial, durante el 2020 se pudo observar que el tipo de cáncer con mayor incidencia es el de seno, seguido del cáncer de pulmón, colorrectal y próstata (figura 1.1A). Mientras que el panorama general en México, los nuevos casos se detectan el cáncer de seno (29929 casos, 15.3%), próstata (26742 casos, 13.7%), colorrectal (14901 casos, 7.6%), de tiroides (11227 casos, 5.7%), cervicouterino (9439 casos, 4.8 %), estomago (8804 casos, 5.4%) y pulmón (7588

casos, 3.9%); que en conjunto son 108630 casos nuevos y representan el 55.6% del total general (Figura 1.1).⁶

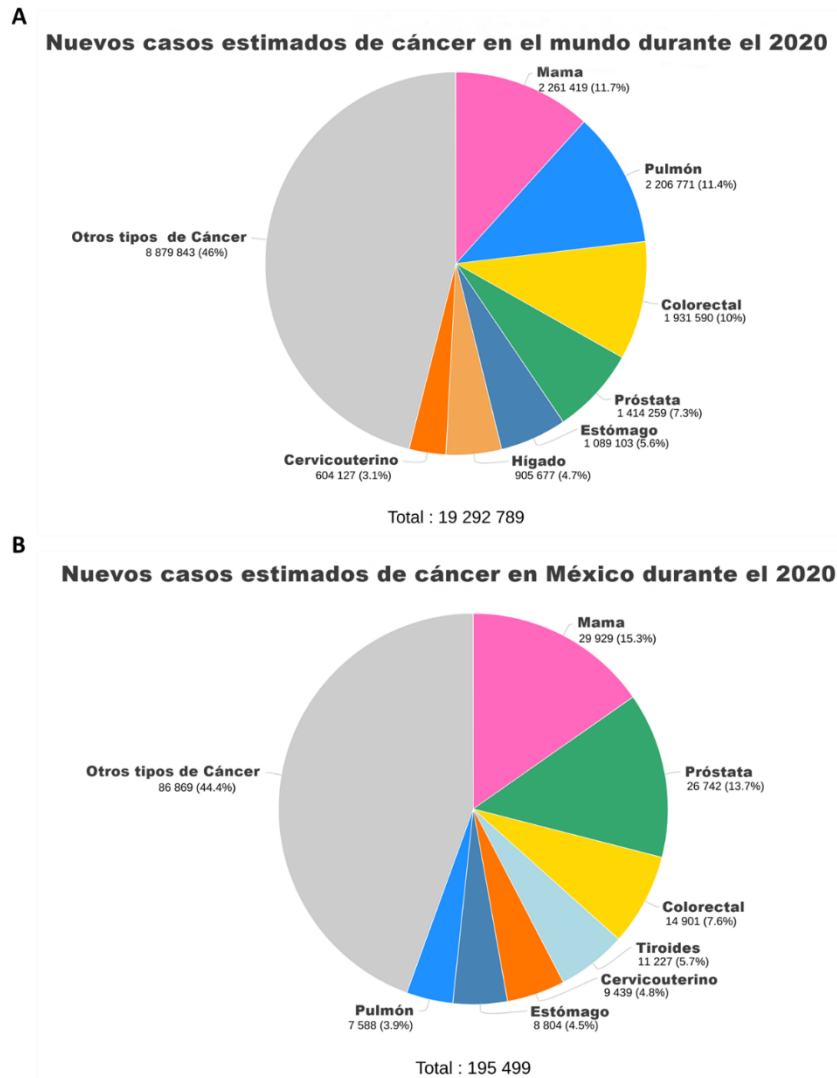
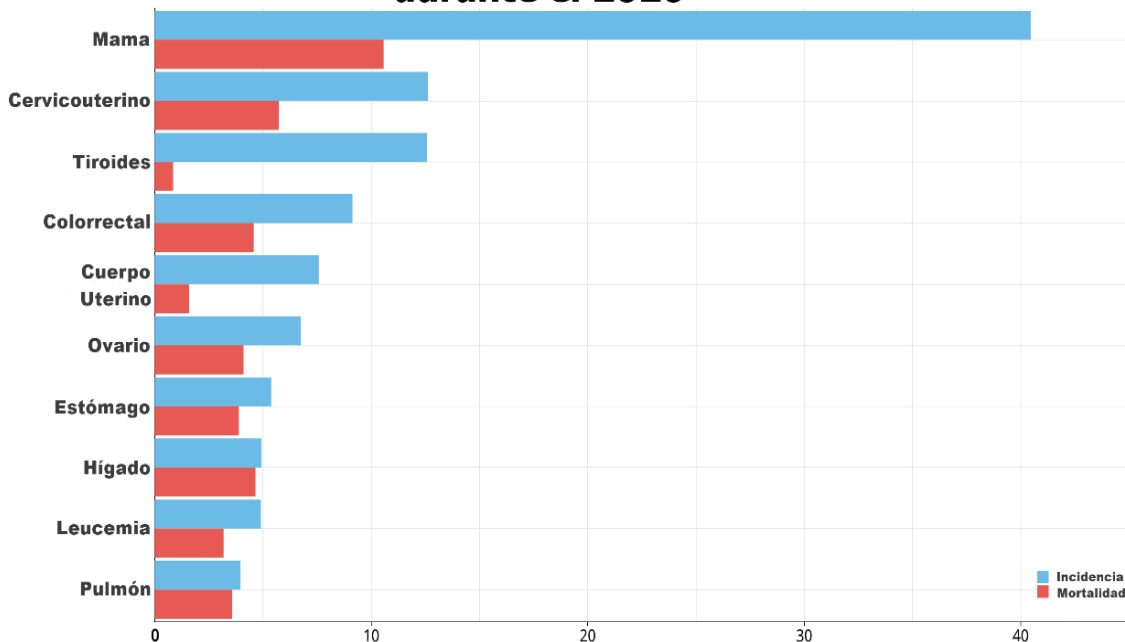


Figura 1.1. Epidemiología del cáncer durante el 2020. Casos estimados de cáncer A) A nivel mundial y en B) México. GCO-Cancer today; 2020.

La incidencia por sexo presenta algunas diferencias. En México, para el caso de las mujeres (Figura 1.2) el cáncer de mayor incidencia es el de seno

(27283 casos), seguido por el de tiroides (10188 casos), cervicouterino (7869 casos), cuerpo uterino (7266 casos), colorrectal (7105 casos), ovario (4759 casos), hígado (3815 casos), estómago (3625 casos), pulmón (3251 casos) y leucemia (2863 casos) (figura 1.2), siendo los de mayor mortalidad el de seno, cervicouterino e hígado, con 6884, 4121 y 3507 muertes respectivamente (Figura 1.2).⁶ En nuestro estudio nos centraremos en células de cáncer cervicouterino.

Casos incidentes y muertes de mujeres por cáncer en México durante el 2020



cáncer en la población femenina de México (2020). GCO-Cancer today; 2020.

1.1.2 Cáncer cervicouterino

Este tipo de cáncer se caracteriza por la proliferación anormal de las células que se encuentran en el cuello de la matriz, generando pequeñas lesiones que se complican con el tiempo.

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino es uno de los de mayor incidencia y mortalidad asociados a la población femenina,⁶ es decir, la tasa de recuperación es baja. Lo anterior, a pesar del buen manejo de la enfermedad.⁷

Existe evidencia de que el principal agente etiológico de este tipo de cáncer es el virus del papiloma humano (VPH),⁸⁻¹⁰ por lo cual, se han desarrollado vacunas que pueden prevenirlo hasta en un 70%.¹¹⁻¹³ De no ser así, esta enfermedad puede detectarse en estadios tempranos y las pacientes son tratadas con cirugía y radioterapia, consiguiendo una supervivencia global a 5 años del 70-90%.¹¹ Por el contrario, si se detecta en estadios avanzados, entonces la supervivencia se reduce al 40-50%.^{7,14}

Cabe destacar que la terapia farmacológica para esta enfermedad suele incluir cisplatino, 5-Fluorouracilo, paclitaxel y topotecan, los cuales inducen importantes reacciones adversas a las pacientes.^{15,16}

1.1.3 Carcinogénesis

El cáncer se desarrolla mediante el proceso de carcinogénesis, que involucra varias etapas en las cuales hay modificaciones (mutaciones) de genes reguladores de las funciones celulares.

La carcinogénesis consta de tres etapas: iniciación, promoción y propagación (Figura 1.3).¹⁷⁻¹⁹ De manera general, en la etapa de iniciación se produce una mutación heredable en una célula en particular, esto puede ser debido a factores (Carcinógenos) químicos, físicos o biológicos. Si esta célula no

es eliminada mediante apoptosis, entonces entra a la segunda etapa de la carcinogénesis.^{18,20} Durante la progresión se realiza una expansión clonal selectiva de las células donde agentes exógenos y endógenos denominados promotores tumorales aumentan la proliferación celular y/o inhiben la apoptosis; esta expansión clonal genera una lesión preneoplásica.^{18,19} Por último, en la etapa de propagación la lesión preneoplásica se convierte en una neoplasia, en la cual las células anormales acumulan mutaciones que permiten una mayor propagación que las células normales.¹⁸

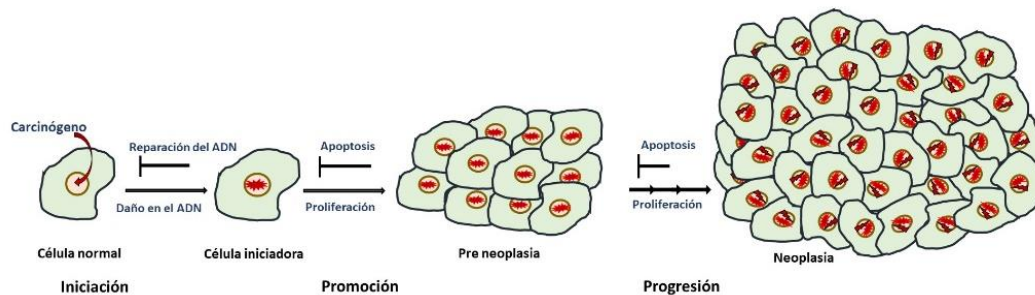


Figura 1.3. Fases de la carcinogénesis.

1.1.4 Ciclo celular

De manera normal la proliferación celular es el proceso por el cual una célula progenitora crece y se divide para producir dos células hijas. Se desarrolla a través de una secuencia de cuatro fases que conforman el ciclo celular (figura 1.4). Estas fases son síntesis (S), segregación mitótica (M) y dos fases intermedias (G1 y G2); mientras que las células que no pueden dividirse entran a un estado de reposo (G0).²¹⁻²³

Durante la Fase G1, la célula progenitora experimenta un periodo de crecimiento y se realiza la síntesis de macromoléculas (proteínas, lípidos, ARN). En la fase S, se realiza la síntesis de ADN, posteriormente, la célula entra a otra fase de crecimiento (G2). Por último, la célula progenitora realiza la mitosis dividiéndose de manera equitativa en dos células hijas a través de la citocinesis.^{21,24}

Es importante mencionar que el paso de la célula en el ciclo celular se encuentra regulado a nivel molecular por cinasas dependientes de ciclinas (**CDK** del inglés *Cyclin-Dependent Kinases*), proteínas que realizan la fosforilación de moléculas claves para la síntesis de ADN y segregación de cromosomas.^{21,23,25,26} Las cinasas dependientes de ciclinas son heterodímeros constituidos por una unidad cinasa y una unidad ciclina. Las ciclinas se asocian a una fase, transición o grupo de fases del ciclo celular que promueven los eventos de cada etapa (figura 1.4). Sin embargo, la actividad de las CDK's también está regulada de forma negativa por los inhibidores de CDKS (CKI); los cuales se unen a los complejos ciclina-CDK y bloquean su actividad.^{23,27,28}

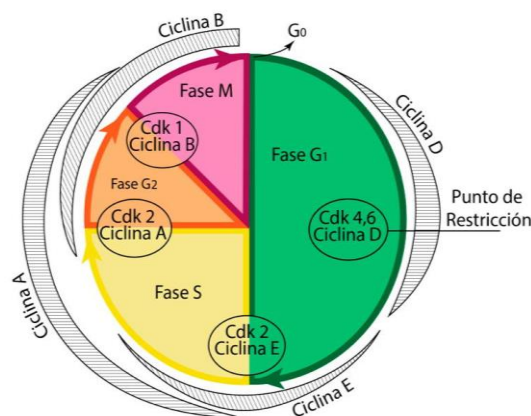


Figura 1.4. Fases del ciclo celular.

1.1.5 Características moleculares del cáncer

Hanahan y Weinberg a través de una amplia búsqueda bibliográfica propusieron características que definen a las células tumorales (figura 1.5), sin importar el tipo de cáncer. Tales particularidades ayudan a entender la enfermedad y las estrategias para combatirla. De primera instancia en el año 2000 se propusieron las siguientes características:²⁹ El mantenimiento de señales de proliferación, la evasión de supresores de crecimiento, la invasión y metástasis, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa y la inducción de angiogénesis. Posteriormente en el 2011 se adicionaron la desregulación metabólica, la evasión de la destrucción inmune, la inestabilidad genómica y la promoción de la inflamación debido al tumor.³⁰



Figura 1.5. Características moléculas del cáncer.
Hanahan & Weinberg, 2011, con modificaciones.

1.1.5.1 Mantenimiento de señales de proliferación

De manera normal, las células y los tejidos que constituyen se encuentran en continua homeostasis, por lo que cuentan con un control meticuloso de la generación y liberación de señales de proliferación, que las guían a la entrada y progresión del ciclo celular. Verificando así el mantenimiento de la función y arquitectura del tejido normal.^{18,29}

Como ya se ha mencionado, la principal característica de la célula cancerosa es la proliferación crónica debido a la desregulación de señales que estimulan el crecimiento, las cuales en su mayoría son externas.

En las células cancerígenas se han identificado mutaciones de los genes involucrados en vías de señalización (Oncogenes) que mantienen la proliferación de manera normal. Destaca la producción de ligandos de factor de crecimiento, a los que responden expresando receptores afines, generando una estimulación autocrina.^{31,32} Asimismo, el incremento de receptores de superficie celular, haciendo que las células sean hiperreactivas a cantidades limitantes de ligando del factor de crecimiento asociado.^{33,34} También son importantes las alteraciones estructurales en los receptores, que facilitan la activación independiente del ligando y la activación constitutiva de componentes de las vías de señalización, que funcionan aguas abajo de estos receptores.²⁹ Por último, también pueden presentar alteraciones en los mecanismos encargados de la retroalimentación negativa.³⁰

1.1.5.2 Evasión de la apoptosis.

La proliferación de las células tumorales no solo está en función de la división celular, sino también está condicionado por la tasa de muerte celular. La disminución celular se ha asociado a la apoptosis que es uno de los principales mecanismos que ayudan a mantener la homeostasis tisular y es promovido por varios estímulos.³⁵

Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis y la más común es la pérdida de la función supresora de TP53. Estas células también pueden evadir apoptosis, al incrementar la expresión de los reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de las señales de supervivencia (IGF 1/2), al regular a la baja los factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma) o desregular la vía de muerte inducida por ligandos extrínsecos.^{36,37} También se ha observado que la vía PI3 AKTquinasa/PKB transmite señales antiapoptóticas y se activa por los factores IGF-1/2 o IL3, por señales que emanan de Ras o por pérdida del supresor tumoral pTEN, enzima que atenúa la señal de AKT.³⁸

La multiplicidad de mecanismos que inducen la apoptosis presumiblemente puede reflejar la diversidad de señales inductoras de apoptosis que evitan las células cancerígenas resistentes a la de muerte.

1.1.6 Mecanismos moleculares que previenen el cáncer en células dañadas

1.1.6.1 Apoptosis

La célula cuenta con mecanismos moleculares de defensa que ayudan a controlar el proceso de proliferación, entre ellos están la síntesis de proteínas involucradas en la reparación del ADN, acortamiento de telómeros y la apoptosis o muerte celular.

Entre los inductores de apoptosis destacan los desequilibrios en las vías de señalización, niveles elevados de oncogenes y el daño al ADN asociado a la hiperproliferación.^{39,40} Tales estímulos terminan confluyendo en vías que activan a las cisteínas proteasas, también conocidas como caspasas que llevan a cabo la degradación celular.

La apoptosis consta de dos circuitos (figura 1.6), uno que recibe señales extracelulares y receptores de membrana (vía extrínseca) e involucra al ligando de Fas y otros relacionados y el otro procesa las señales intracelulares (vía intrínseca) y se asocia a caspasas.^{35,38,41,42} El mecanismo apoptótico intrínseco se identifica como una barrera contra la patogénesis del cáncer. La regulación de la vía intrínseca de la apoptosis se controla mediante el equilibrio de los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de proteínas reguladoras Bcl-2 y algunos miembros de su familia como Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1.³⁹

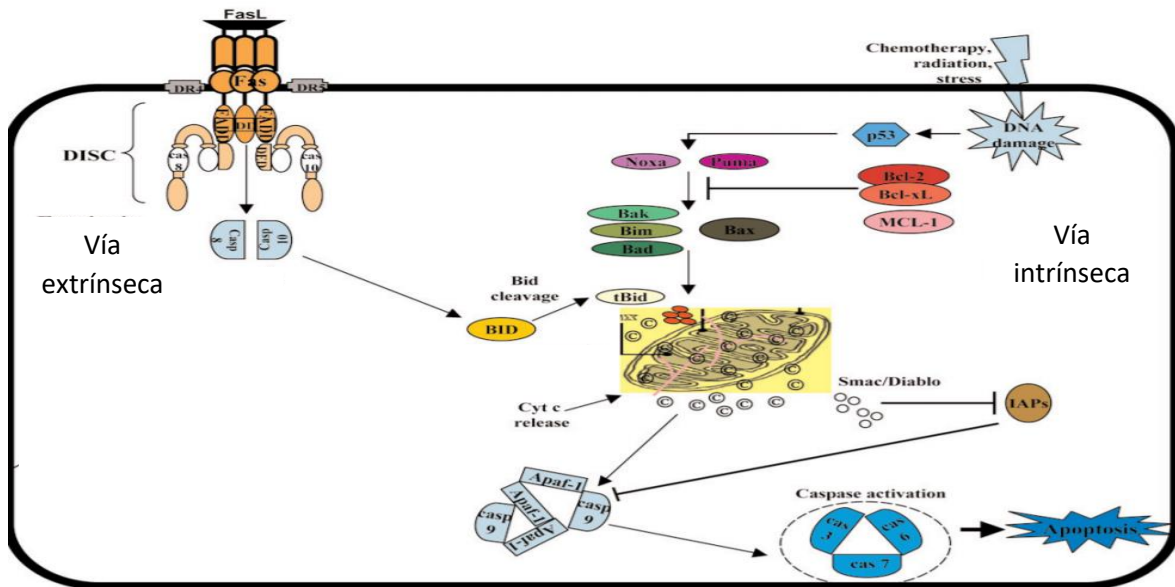


Figura 1.6. Apoptosis vía extrínseca e intrínseca. El inicio de una vía en particular depende del tipo de señal recibida por la célula; la vía extrínseca se activa debido a señales extracelulares que son censadas por los receptores de muerte (FAS); mientras que la vía intrínseca se activa cuando se detecta daño celular y se accionan proteínas proapoptóticas de la superfamilia Bcl2. Lewis y Jordan; 2009 con modificaciones.

La vía extrínseca comienza en el exterior de la célula con la activación de receptores de muerte tipo Fas, mediante la unión con su ligando (FasL), esta interacción genera el reclutamiento de proteínas FADD, que son adaptadoras y reclutadoras de caspasas iniciadoras 8 y 10. Las caspasas 8 y 10 activas en el citosol pueden activar de manera directa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7.^{41,43}

Por otra parte, la vía intrínseca Inicia cuando se reconoce alguna alteración en el ciclo celular, hipoxia, estrés severo o daño en el genoma que es censado por la proteína p53. En estos casos, p53 se une a promotores de las proteínas Puma y Noxa. A su vez Puma y Noxa activan a otras proteínas proapoptóticas como Bax y Bak, las cuales se incrustan en la membrana externa mitocondrial generando una permeabilización, que permite la salida del citocromo C hacia el citoplasma. Es ahí

donde junto con la proteína Apaf-1 y la caspasa 9 forman apoptosomas que activan a las caspasas 3, 6 y 7 para inducir apoptosis.^{38,41,44} Si estos mecanismos de defensa molecular fallan las células resultan ser más susceptibles al proceso de carcinogénesis.

1.1.6.1.1 Catástrofe mitótica

La catástrofe mitótica es un mecanismo celular intrínseco que detecta el fallo mitótico y conduce a la célula a la muerte o senescencia. Puede ser inducida por agentes que dañan directamente al ADN o interrumpen la progresión mitótica.⁴⁵⁻⁴⁷ En el caso de los agentes antimitóticos la detención de esta fase del ciclo celular se debe a fallas en la dinámica de los microtúbulos, por la acción de agentes polimerizantes o despolimerizantes.⁴⁸

1.1.6.1.1.1 Microtúbulos

El Citoesqueleto está constituido por proteínas del citoplasma que polimerizan en estructuras filamentosas. Dentro de estas proteínas se encuentran los microtúbulos con longitudes de 1 a 100 μm y 25 nm de diámetro. Tienen un papel crucial como organizadores internos en las células eucariotas y están involucrados necesariamente en la división celular ya que forman el huso mitótico, intervienen en el desplazamiento celular, y permiten la polarización de ciertos tipos celulares.^{49,50} Así como también están involucrados en la disposición espacial de orgánulos, en la comunicación a través de vesículas o macromoléculas entre los compartimientos celulares.⁵¹

Los microtúbulos están constituidos por dímeros de proteínas globulares conocidas como tubulina α y β . Los dímeros α y β se organizan ordenadamente a través de enlaces no covalentes y forman filas denominadas protofilamentos; normalmente se pueden encontrar 13 protofilamentos en un microtúbulo.^{52,53}

Otra característica importante de los microtúbulos es la polaridad que está dada por la polaridad estructural de los monómeros α y β de la tubulina los cuales siempre forman un extremo de los protofilamentos. Es decir, la α -tubulina genera los extremos (-) y la β -tubulina el extremo (+), lo que a su vez genera protofilamentos orientados de una misma manera, culminando con la polaridad del microtúbulo (figura 1.7).

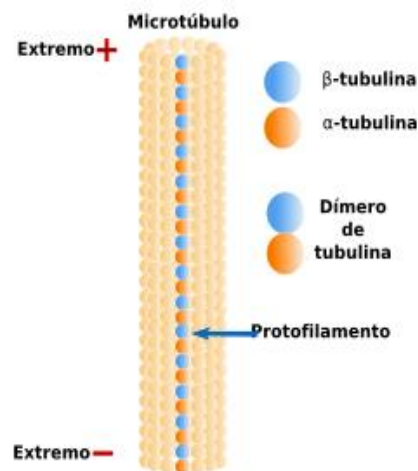


Figura 1.7. Organización de las subunidades α y β de la tubulina en un protofilamento. Cooper & Hausman, 2017. **Figura 1.2. Epidemiología del**

La estructura del microtúbulo es muy dinámica ya que presenta preferentemente polimerización en el extremo (+) y despolimerización en el extremo (-). Los dímeros α y β de tubulina libres en el citosol están unidos a dos moléculas de GTP, uno a cada monómero, por lo tanto, cuando un dímero se une

a un microtúbulo que está en crecimiento en la subunidad β (+) se produce la hidrólisis del GTP, obteniendo una molécula de GDP unida a la subunidad β (figura 1.8).^{18,54–56}

Los microtúbulos se asocian con proteínas que se encargan de controlar su polimerización y despolimerización, estas proteínas son conocidas como MAPs por sus siglas en inglés (*Microtubule Associated Proteins*).^{57,58} Las MAPs se clasifican con base en el efecto que ejercen sobre el microtúbulo y pueden ser estabilizadoras o desestabilizadoras.^{53,59,60} Existen también ciertas moléculas ajenas a la célula que se han usado como medicamentos y afectan la polimerización y despolimerización como la colchicina⁶¹ y el taxol,⁶² respectivamente.

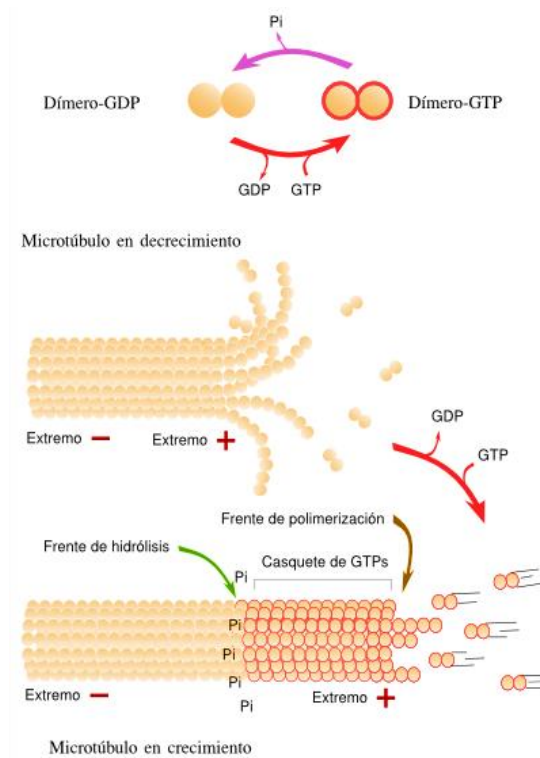


Figura 1.8. Dinámica de la polimerización y despolimerización del microtúbulo. Cooper & Hausman; 2017.

1.1.7 Tratamiento

Es importante mencionar que los tratamientos contra los diferentes tipos de cáncer son principalmente: la cirugía, la radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y combinación de los tratamientos anteriores. El tipo de tratamiento a elegir dependerá del tipo de cáncer, el tamaño del tumor, su ubicación dentro del cuerpo y la etapa en la cual se encuentre.

De primera instancia la cirugía es un procedimiento por el que un médico cirujano extirpa el cáncer del cuerpo. Se emplea en personas con tumores sólidos y que están contenidos en un sitio específico del cuerpo.^{63,64}

La radioterapia es un tratamiento que usa altas dosis de radiación, generando daño en el ADN de las células; se puede emplear cuando el tumor se encuentra localizado y/o comienza a extenderse a tejidos vecinos.⁶⁵ Es importante destacar que esta terapia puede afectar también a células normales cercanas al sitio de radiación, estas células con gran frecuencia pueden contrarrestar el daño y volver a funcionar de manera normal.

A pesar de que la cirugía y la radioterapia son utilizados como tratamientos primarios en la gran mayoría de los cánceres localizados, los tratamientos contra el cáncer como la quimioterapia, las hormonas y terapias biológicas, resultan ser las opciones más utilizadas en los cánceres metastásicos.

La quimioterapia es un tratamiento sistémico que se basa en la inhibición de la proliferación de las células cancerosas, pero puede afectar a células normales

con altas tasas de proliferación como las del tracto gastrointestinal, médula ósea y folículos pilosos.⁶⁶⁻⁶⁸ La afectación a estas poblaciones celulares normales da pie a los efectos secundarios de esta terapia. Los fármacos utilizados en la quimioterapia pueden actuar sobre las distintas fases del ciclo celular o en los mecanismos que regulan la proliferación celular.

Los quimiofármacos pueden tener más de un mecanismo de acción, predominando uno de ellos, podemos identificar a 4 grupos.⁶⁹ El primer grupo actúa sobre el ADN de las células tumorales, aquí se encuentran los agentes alquilantes,^{70,71} antimetabolitos,^{72,73} derivados de platino^{74,75} y derivados de camptotecinas.^{76,77} En el segundo grupo encontramos a los fármacos que intervienen en la mitosis sin afectar el ADN, los cuales en su mayoría son de origen vegetal.⁷⁸⁻⁸⁰ Dentro del tercer grupo, encontramos a los quimiofármacos que ejercen su efecto sobre factores extracelulares de división celular y pueden ser antagonistas de estrógenos⁸¹ o andrógenos,^{82,83} interferones y progestágenos.⁸⁴ Por último, en el cuarto grupo se encuentran los fármacos con efecto sobre el sistema inmune, como lo son el factor de necrosis tumoral, interleucinas, anticuerpos monoclonales, activación de células dendríticas o células citotóxicas, construcciones de células citotóxicas, como las CARs (del inglés *Chimeric Antigen Receptors*)^{85,86} y vacunas.⁸⁷

Aun cuando se han realizado avances importantes en el tratamiento del cáncer, la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos continúa siendo un problema importante en la terapia del cáncer y es responsable de la mayoría de

las recaídas y de los malos resultados de supervivencia en los pacientes.⁸⁸ Es importante mencionar que uno de los mecanismos de resistencia a fármacos se asocia al eflujo de estas moléculas a través de los transportadores de tipos ABC, destacando a la glicoproteína P (gp-P).^{89,90} Una gran variedad de fármacos pueden ser transportados por esta glicoproteína, como doxorubicina, paclitaxel, mitomicina c, topotecan, vincristina y vinblastina;⁹¹ generando una disminución de la concentración del fármaco en la célula y de sus efectos. Sin embargo, son también los productos naturales los que ayudan a superar la resistencia a fármacos, al ser administrados en combinación con los medicamentos existentes. Algunos productos naturales con estas características son: sesquiterpenos, flavonoides, alcaloides, saponinas y compuestos polifenólicos.⁹²

1.2 PRODUCTOS NATURALES

Los productos naturales son compuestos producidos por bacterias, organismos marinos, plantas o animales. Se producen como metabolitos secundarios, ayudan a la adaptación o sobrevivencia de un organismo a un ecosistema particular.⁹³

Desde la antigüedad, se han utilizado diversos productos naturales como medicina tradicional contra diferentes enfermedades. Los productos naturales se han caracterizado por tener un enfoque terapéutico fácilmente aplicable, económico, accesible y aceptable con una citotoxicidad mínima.⁷⁹ Los productos naturales pueden ser utilizados como agentes terapéuticos ya sea de manera

directa, de materia prima para la síntesis de sustancias con interés farmacológico o para generar productos sintéticos basados en productos naturales particulares.⁹⁴

1.2.1 Productos naturales contra el cáncer

Un gran número de productos naturales son capaces de modular el microambiente de las células cancerígenas y diversas cascadas de señalización celular; desempeñando así un papel importante en la lucha contra el cáncer. Se ha encontrado que estos compuestos son efectivos contra varias vías de señalización, principalmente vías de muerte celular (apoptosis y autofagia) y vías de desarrollo embrionario (vía Notch, vía Wnt y vía Hedgehog). Cabe destacar que son más de 3000 especies de plantas las que se han reportado para tratar esta enfermedad.⁷⁹

El mecanismo de acción de la gran mayoría de los productos naturales utilizados como anticancerígenos, se basa en la afectación de la mitosis de las células anormales. Esto se debe a las alteraciones que los productos naturales ejercen sobre el citoesqueleto, principalmente sobre la tubulina. Se han descrito siete sitios de unión a la tubulina para compuestos exógenos (figura 1.9), los cuales reciben el nombre del ligando para el cual fueron descritos por primera vez. Estos sitios corresponden a la interacción con los taxanos, Lau/Pel, Maytansina, alcaloides de la vinca, colchicina, pironetina y gatorbulina-1.⁵⁷

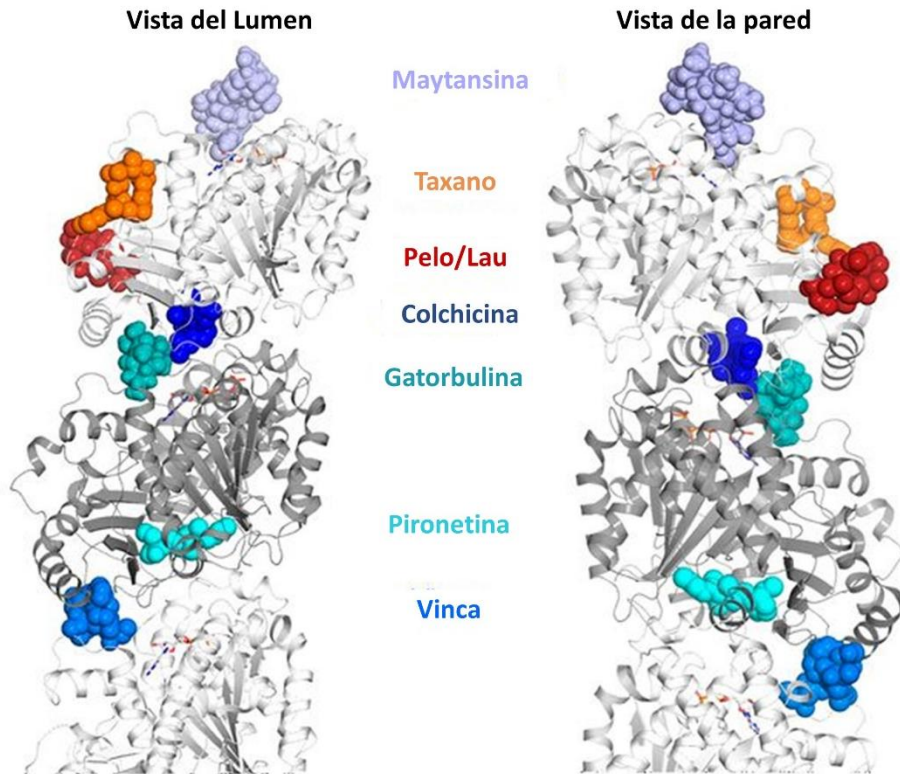


Figura 1.9. Sitios de unión de ligandos exógenos en la tubulina. Matthew *et al.*; 2021⁹⁰ con modificaciones.

Estos siete sitios se pueden dividir en dos grupos (figura 1.10), en el primer grupo de moléculas encontramos las que se unen a la tubulina favoreciendo el ensamblaje de microtúbulos y su resistencia a la despolimerización, alterando su funcionalidad. Aquí se encuentra el grupo de los taxanos, que son los compuestos citostáticos más importantes, destacando el paclitaxel que se obtiene a partir de la corteza del tejo americano (*Taxus brevifolia*). El paclitaxel se une a la subunidad β de la tubulina y estabiliza los protofilamentos. El siguiente sitio es el denominado Lau/Pel, el cual hace alusión a los ligandos Laulimalida y Pelorusida, aislados por primera vez de las esponjas marinas *Caccospongia mycofijiensis* y *Mycale*

hentscheli;⁹⁵ estas moléculas se unen a la subunidad β con una orientación hacia la parte externa del microtúbulo, actuando como abrazaderas moleculares que inhiben la despolimerización.⁹⁶

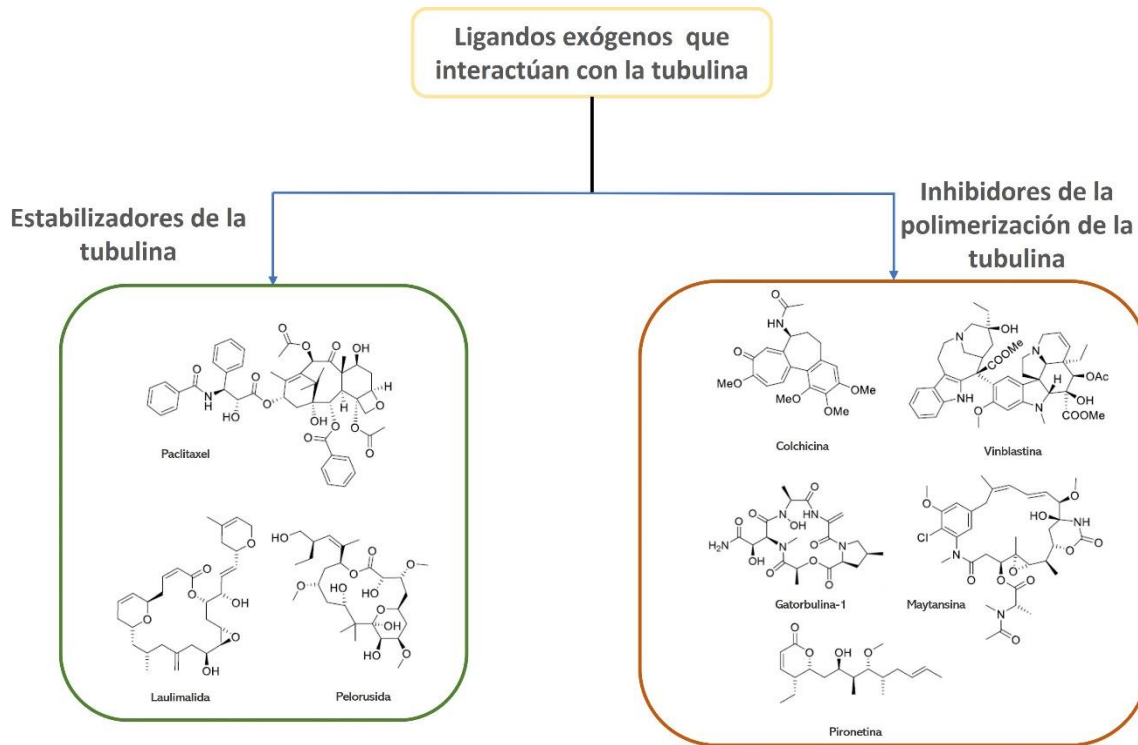


Figura 1.10. Clasificación de los ligandos exógenos de tubulina

El segundo conjunto de moléculas, son los inhibidores de la polimerización de la tubulina, los cuales se unen a regiones concretas de esta proteína distinguiéndose así cinco sitios. El primer sitio de interacción, es de los alcaloides de la vinca, siendo vinblastina y vincristina las moléculas más representativas.^{55,56} Estos ligandos se unen a las subunidades β de la proteína cerca del sitio de unión a GTP, afectando el intercambio GTP-GDP. A bajas concentraciones actúa estabilizando la dinámica de los microtúbulos.⁹⁷ Tanto vincristina y vinblastina se

extraen de la planta *Catharanthus rose*. Estas dos moléculas cuentan con estructuras muy similares, pero con rangos de actividad diferente. El segundo sitio tiene interacción con la maytansina, que fue aislada del arbusto *Maytenus ovatus*. Este ligando interactúa con la subunidad β cerca del sitio de unión de la vinblastina y GTP.⁹⁶ El tercer sitio de unión es el de la pironetina, esta molécula es una lactona α/β insaturada, aislada de caldos de fermentación de especies de *Streptomyces* y se une covalentemente a Lys352 de α -tubulina.^{98,99} El cuarto sitio de interacción es el de la Gatorbulina-1, un pentapéptido aislado de la cianobacteria marina *Lyngbya cf. confervoides*, la interacción se lleva a cabo en la interfaz intradimérica de la tubulina.⁵⁷ El quinto sitio es el de la colchicina,¹⁰⁰ tres de los principales ligandos que interactúan con este bolsillo hidrofóbico de la proteína son la colchicina, combrestastatina y podofilotoxina.¹⁰¹⁻¹⁰³ Esas moléculas se unen en la interfaz de las subunidades α y β . A su vez este sitio de unión se subdivide en tres zonas: Zona 1 en la cual el anillo de tropolona de la colchicina interacciona, zona 2 en la cual interacciona el anillo trimetoxifenilo y la zona 3 en donde no hay acceso a la colchicina, generando modos de unión diferentes al de la colchicina (figura 1.11).¹⁰⁴

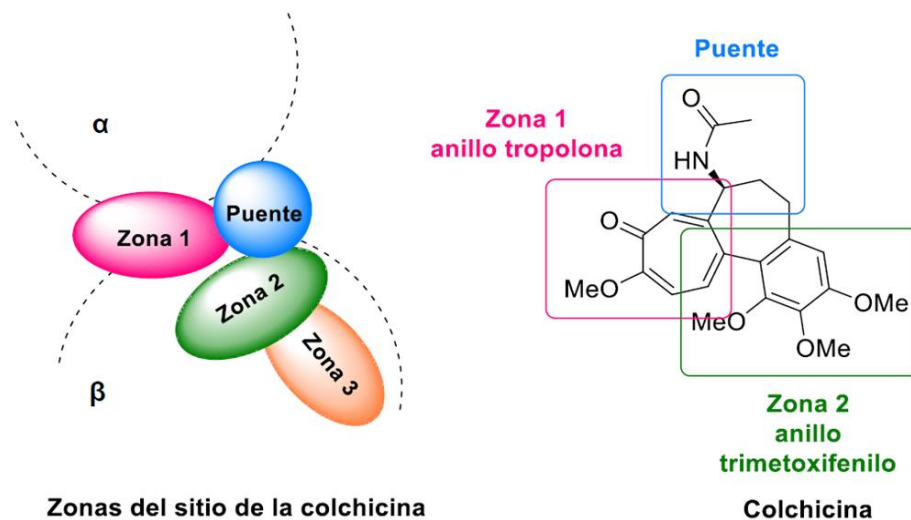


Figura 1.11. División del sitio de unión de la colchicina. AECC, 2018.¹⁰⁴

1.2.1.1 Ácido gálico y derivados

Uno de los compuestos de origen vegetal y con un reconocido efecto citotóxico es el ácido gálico (AG) (figura 1.12), que ha sido aislado de plantas, frutas y verduras. Se obtiene directamente de la materia vegetal o a partir de la hidrólisis del ácido tánico.^{105,106} Cuenta con diversas actividades como antiinflamatoria, antioxidante, prooxidante, citotóxico, antiangiogénica y antibiótica.

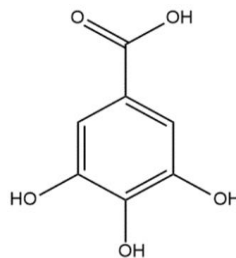


Figura 1.12. Estructura del ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (Ácido gálico)

Respecto a su efecto anticancerígeno, hay estudios en modelos animales y en cultivos *in vitro* de líneas de diferentes tipos de cáncer como el de mama, vejiga, próstata, hígado, leucemia y gliomas.¹⁶ Tal efecto está relacionado a sus propiedades anti y prooxidantes, y a su efecto como segundo mensajero en diferentes vías de señalización, destacando la vía apoptótica.¹⁰⁷ Se ha observado en cultivos de células promielocíticas de leucemia que diferentes concentraciones de AG inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's), principalmente H₂O₂ intracelular, induciendo la apoptosis temprana. La inducción de esta vía por acción del AG también se ha estudiado en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón, en donde se prende la vía apoptótica debido a la intervención de Bcl-2 y de las caspasas 3, 8 y 9.¹⁰⁸

Otro punto a favor del uso del AG es la selectividad que presenta al menos en las células que conforman a los gliomas, pues reduce la viabilidad de las líneas celulares U87 y U251, sin afectar a las células epiteliales normales de cerebro de ratón.¹⁰⁹

Una de las desventajas del ácido gálico, es que resulta ser una molécula que apenas en los últimos 10 años ha tenido un incremento respecto a su investigación, esto de acuerdo con los datos de PubMed. La mayoría de los estudios se enfoca en su efecto como antioxidante, mediante ensayos de DPPH, FRAP y ABTS; mientras que las pruebas para evaluar al AG en animales, particularmente ratas son menores, por lo tanto, aun no se tiene la información necesaria para ser llevado a la clínica. Por otra parte, una desventaja más del AG

es que a pH fisiológico (7.4), los ácidos se encuentran en forma de carboxilato generando inestabilidad y toxicidad metabólica; absorción y biodisponibilidad erráticas; y limitada difusión pasiva a través de las membranas.¹¹⁰ Sin embargo, se están implementando nuevas estrategias para una mejor biodisponibilidad del ácido gálico, mediante la administración dirigida con varias nanoestructuras.¹¹¹

En cuanto a los derivados del AG, el galato de etilo también ha presentado efecto antiproliferativo y a su vez induce apoptosis en líneas de cáncer de mama (MDA-MB-231).¹¹² Algunos otros derivados como los ésteres alquílicos (metil, propil y octil galato; figura 1.13) también inhiben la proliferación e inducen apoptosis en líneas tumorales de ratón.¹¹³

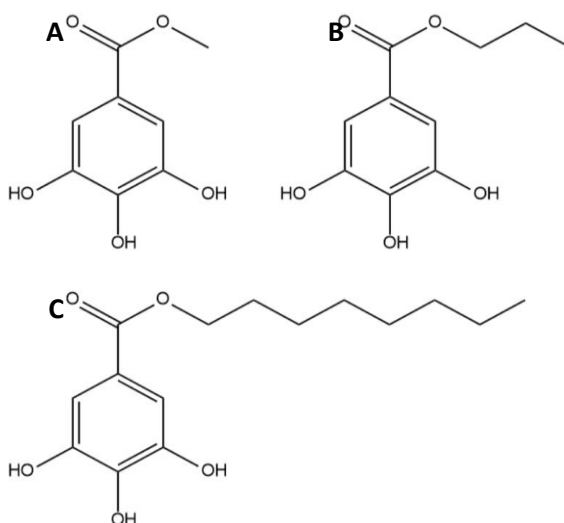


Figura 1.13. Derivados del ácido gálico: Ésteres alquílicos. A) Galato de metilo, B) Galato de propilo y C) Galato de octilo

En nuestro grupo de trabajo, se ha realizado investigación en torno al galato de etilo, su efecto citotóxico y proapoptótico en un modelo de carcinoma de hígado humano, obteniendo IC₅₀ 38, 75 y 211 μ M para las líneas Hep 3B, Hep G2 e IHH respectivamente.¹¹⁴ También se han estudiado otros tipos de cáncer entre ellos próstata (PC3) y cervicouterino (HeLa).¹¹⁴ Por otra parte, se indagó en el uso del ácido gálico como coadyuvante en el tratamiento del cáncer de ovario, se utilizaron las líneas A2780 y A2780AD, esta última es resistente a paclitaxel (figura 1.14). En la figura 2 se observó que el tratamiento conjunto de AG y paclitaxel disminuyen en gran medida la viabilidad celular en ambas líneas incluso en la resistente.¹¹⁵ Poniendo al AG como una alternativa muy prometedora en el tratamiento de algunas neoplasias.

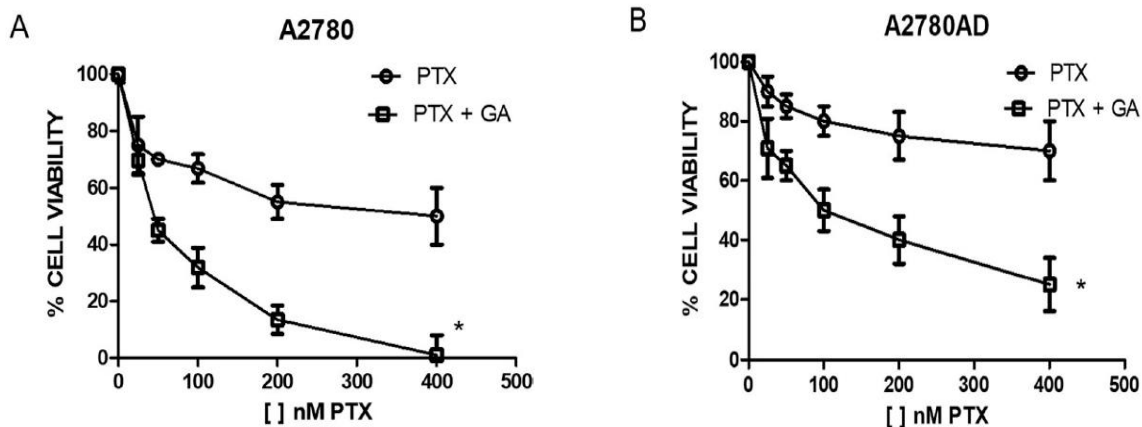


Figura 1.14. Efecto citotóxico de la combinación del AG y Paclitaxel (PTX) en cáncer de ovario. A) Efecto de diferentes concentraciones de PTX, solo y combinado con 50 μ M de AG en la línea celular A2780 B) Mismo tratamiento que la línea A2780, pero utilizando 100 μ M de AG. Sánchez-Carranza; 2018.

1.3 DISEÑO DE FÁRMACOS

En la actualidad el desarrollo de nuevos fármacos es cada vez más seguro, específico y efectivo, respecto al tratamiento para el cual fueron diseñados. Esto está basado en que los nuevos fármacos se desarrollan con un diseño racional.¹¹⁶

1.3.1 Variación molecular (modificaciones moleculares)

En cuanto a los procesos tradicionales para el diseño de fármacos, se obtiene información empírica a través de la observación, dando pie a moléculas líderes o cabezas de serie. Estas moléculas activas pueden proceder de la medicina tradicional o compuestos generados a través de la síntesis química o biotecnológica. Una vez identificada la molécula líder o cabeza de serie se realizan modulaciones o variaciones en su estructura con el fin mejorar la potencia de la molécula líder, potenciar acciones secundarias deseadas, eliminar efectos secundarios no deseados, combinar actividades y mejorar su biodisponibilidad.¹¹⁷ Todo lo anterior debido a la estrecha relación entre los compuestos obtenidos y la cabeza de serie. En muchos de los casos se pueden obtener compuestos más simples con mejor actividad que la molécula líder.

1.3.2 Diseño racional de fármacos asistido por computadora

Respecto al diseño racional de fármacos, cada día se conocen mejor las bases biológicas de una enfermedad, lo que permite profundizar en el proceso fisiológico basado en interacciones entre proteínas o entre proteínas y moléculas pequeñas (ligandos), como el caso de la unión fármaco-objetivo (proteína). Por lo que es importante destacar que desde la aparición de la difracción de rayos X,

asociada con la identificación de la composición química y de la geometría tridimensional (3D), se han resuelto un amplio número de proteínas, tanto por rayos X, como por resonancia magnética nuclear (RMN).¹¹⁸ Dichas resoluciones de estructuras, composición química y posiciones relativas en 3D de cada átomo en una proteína, ha generado la evolución extensa de la búsqueda para encontrar nuevas moléculas de importancia que actúen como nuevos fármacos. Aunado a lo anterior, el surgimiento de modelos computacionales basados en leyes físicas permitió imitar las interacciones entre moléculas y átomos, generando un conjunto de aproximaciones a sistemas reales a través de experimentos *in silico* o virtuales.

Este tipo de diseño se basa en la asistencia de la computadora para el análisis de nuevas moléculas, y así poder relacionar una estructura química con una actividad biológica.¹¹⁹ Esto ayuda a descubrir moléculas activas, optimizar las ya conocidas y seleccionar las mejores dentro de un grupo determinado con características específicas y detectar más compuestos en menos tiempo a un menor costo.¹²⁰

Como estrategia general, los fármacos tienen su función con base en la interacción con macromoléculas presentes en el organismo, generando dos ramas principales en su diseño: Diseño basado en la estructura del receptor y diseño basado en la estructura del ligando.¹¹⁶ En el primer caso se toma en cuenta la estructura tridimensional de la macromolécula que interactúa con el ligando, mientras que el segundo, se basa en el estudio de la estructura química de la molécula con actividad biológica o ligando.

1.3.2.1 QSAR

En el diseño de fármacos basados en la estructura del ligando, encontramos un método muy común denominado estudio QSAR. Dicho método tiene su origen en los años 60's, a través de los estudios *in silico* desarrollados por Corwin Hansch y Toshio Fujita.

La definición del modelado QSAR es la relación matemática entre una respuesta (actividad, propiedad, toxicidad y otras) y características fisicoquímicas definidas por los descriptores moleculares de las moléculas analizadas. Por lo que la finalidad de este estudio es generar modelos matemáticos predictivos y que puedan ayudar a evaluar la actividad de compuestos químicos nuevos que no se han sintetizado, ni evaluado experimentalmente, esto a través de sus propiedades fisicoquímicas.¹²¹ Las actividades biológicas hacen referencia al efecto farmacológico que tiene un compuesto sobre un blanco molecular (Efecto citotóxico, antiinflamatorio, antipirético, antitusivo, antihistamínico, etc.). Mientras que las características fisicoquímicas hacen alusión a la solubilidad, lipofilicidad, ionización etc. Por lo que los descriptores moleculares son números útiles o resultados de experimentos estandarizados, obtenidos de estructuras químicas específicas.¹¹⁶

El modelo QSAR se desarrolla partiendo de los compuestos para los cuales se tenga una determina evaluación experimental de la actividad, lo que permite realizar la predicción de la actividad de un mayor número de moléculas.¹²² Este tipo de estudios es útil en la predicción de actividad biológica/química de interés, la

optimización de la síntesis química de moléculas de interés, en la comprensión de mecanismo de acción de un grupo particular de moléculas, en la predicción de toxicidad de los compuestos, en la identificación de compuestos peligrosos en etapas iniciales del diseño y en el refinamiento estructural de las moléculas a sintetizar.

Los estudios QSAR constan de cuatro pasos: Búsqueda de moléculas, diseño molecular, generación del modelo y validación estadística. Es decir, se comienza a recabar la información de moléculas con la actividad biológica que nos interesa; para que después éstas sean dibujadas y optimizadas a través de procesos lógicos matemáticos. A partir de este proceso, se generan se generen descriptores moleculares que serán fundamentales para la creación del modelo, al cual se le realiza la validación estadística, que consiste en evaluar la capacidad que tiene el modelo QSAR para predecir con exactitud la actividad biológica de interés.¹¹⁶ Un modelo QSAR se representa de la siguiente manera:

$$y=C_1X_1+C_2X_2+\dots+C_nX_n+b$$

Donde:

y: Es la actividad biológica

C_n= Constantes arrojadas por el modelo

X_n: Descriptores involucrados en la actividad biológica

b: Intercepto del origen

1.3.2.2 Acoplamiento molecular (*docking*)

Como se mencionó con anterioridad los avances en diferentes campos de la ciencia que implican la purificación de proteínas, la elucidación de estructuras por RMN, la cristalografía y la identificación de nuevos blancos terapéuticos han generado avances en la búsqueda virtual de nuevos fármacos. Dentro de las estrategias de búsqueda implementadas y de gran relevancia, destaca el acoplamiento o *docking* molecular.¹²³

El acoplamiento molecular es una técnica *in silico* que se emplea para predecir las posibles formas en las cuales se puede generar un complejo ligando-receptor, donde el receptor generalmente es un oligómero o una proteína y el ligando es una pequeña molécula u otra proteína.¹²⁴ Cabe mencionar que la gran mayoría de los procesos bioquímicos dependen de las interacciones de los ligandos con sus moléculas receptoras, por lo que el reconocimiento molecular es fundamental en las interacciones enzima-sustrato, proteína-inhibidor y ácido nucleico-inhibidor. Resultando así el *docking* molecular de gran relevancia en el campo de la medicina.

Desde la década de los 80's, se han desarrollado diferentes programas para realizar el acoplamiento de las moléculas, que permitan estudiar y caracterizar las interacciones a nivel atómico entre una proteína y un ligando en el sitio de unión.¹²⁵ Esta caracterización resulta un tanto complicada debido a que se tienen que tomar en cuenta diversos factores como son la movilidad del ligando y del receptor, las interacciones con las moléculas de agua y el efecto de la proteína

sobre distribución de las cargas del ligando.¹²⁶ De manera tradicional para poder realizar el acoplamiento se debe contar con una estructura tridimensional de la biomolécula blanco, la cuál debe ser acondicionada para el análisis y poseer un sitio de unión previamente identificado. También es necesario contar con una variedad de ligandos identificados y con estructuras conocidas que presenten las condiciones adecuadas para realizar su simulación con el blanco (Proteína).^{118,120,127}

La realización del docking implica dos pasos fundamentales: La predicción de la conformación del ligando-proteína y la evaluación de la afinidad de unión. Esto en conjunto tiene como objetivo generar un grupo de conformaciones del complejo (Ligando-Receptor), para poder clasificarlas con base en su estabilidad. En el primer paso del acoplamiento se generan las poses del ligando, es decir, sus posiciones y orientaciones dentro de los sitio de unión, para lo cual se requiere una estrategia de búsqueda. Dicha función o algoritmo de búsqueda debe enumerar un conjunto óptimo de formas de unión del ligando-receptor y tiene que tomar en cuenta el espacio de búsqueda y los grados libertad de rotación y translación de las moléculas. El software realiza una búsqueda sistemática que permite obtener la conformación de mínima energía, cuyo valor será dado por un ΔG (U total en kcal / mol) negativo.¹²⁸ Los algoritmos de búsqueda se pueden clasificar en 3 categorías: 1) Métodos sistematicos (Construcción incremental, búsqueda conformacional y bases de datos), 2) Métodos estocásticos (Monte Carlo, algoritmos genéticos, búsqueda tabú) y 3) Métodos de simulación o

determinísticos (Dinámica molecular, optimización geométrica).¹²⁶ El segundo paso consta en comparar, evaluar y calificar (puntuar) las poses, a través de funciones de puntaje o scoring.^{123,128} Esto para poder diferenciar las poses correctas de las incorrectas en un tiempo de cálculo razonable. Cabe señalar que no hay una función que dé puntaje preciso y eficiente. Por lo tanto, es importante obtener el rango correcto relativo de cada ligando con base en los datos analizados, siendo que los mayores puntajes serán los que mejor se acoplen. Es decir, las funciones de puntuación implican estimar, en lugar de calcular, la afinidad de unión entre la proteína y el ligando y, a través de estas funciones, adoptar diversas suposiciones y simplificaciones.^{123,124} Las tres principales funciones de puntuación son: 1) las basadas en el campo de fuerza, 2) las empíricas y 3) las basadas en el conocimiento. Después del acoplamiento se obtiene una lista de poses que, mediante gráficos, permiten realizar una evaluación visual de la bondad del ajuste, la formación de enlaces de hidrógeno claves (**HB** del inglés *Hydrogen Bond*), interacciones electrostáticas, complementariedad de la superficie y estabilidad del complejo unido respecto a sus formas libres.^{118,129}

1.4 JUSTIFICACIÓN:

Durante los últimos años, el cáncer se ha posicionado dentro de las principales causas de muerte en México y en el mundo, destacando el cervicouterino como uno de los de mayor incidencia asociados a la población femenina. A pesar de contar con tratamientos preventivos y presentar buena supervivencia si se detecta en etapas tempranas, resulta con un pronóstico muy pobre en etapas avanzadas. Esta patología suele ser tratada con cirugía, radioterapia y administración de cisplatino, paclitaxel y combinación de las anteriores. Los efectos adversos que dichos tratamientos pueden llegar a generar, llevan a la búsqueda de nuevas alternativas para contrarrestar esta enfermedad, que permitan mejorar la calidad de vida y la supervivencia de la población afectada. Elegimos al ácido gálico para el estudio y diseño de nuevas moléculas, debido a que ha mostrado entre sus efectos, el citotóxico en experimentos *in vivo* e *in vitro*, tanto en animales como en líneas celulares humanas. Además de que algunos ésteres alquílicos derivados del AG también presentan este efecto, por lo que resulta interesante indagar más sobre la estructura líder de AG y sus posibles derivados.

Con el fin de entender mejor las relaciones estructura y actividad, una de las mejores formas de abordar este tema es a través del diseño racional de fármacos asistido por computadora. Este tipo de aproximación asiste en el descubrimiento de nuevas moléculas activas, optimiza las ya conocidas y selecciona las mejores dentro de un grupo determinado con características específicas. Además, se puede realizar el análisis de un mayor número de

compuestos en menos tiempo a un menor costo. Incluido en el diseño racional de fármacos se encuentra el QSAR, que una de las herramientas clave para el diseño de nuevas moléculas activas. Con ayuda del acoplamiento o *docking* molecular se puede proponer *in silico* la hipótesis del mecanismo de acción. Usando la información anterior, en nuestro trabajo, procedimos a la semi-síntesis, purificación, y elucidación de las moléculas más activas. Finalmente, para poder culminar con la comprobación de nuestro análisis *in silico*, se procedió a la evaluación biológica de los compuestos en la línea celular HeLa y HaCat. A través de este estudio se pudo dar pie a novedosas propuestas terapéuticas mediante el diseño racional de novedosos derivados de AG.

1.5 HIPÓTESIS:

Los derivados del ácido gálico obtenidos a partir de un diseño racional de fármacos tendrán un efecto citotóxico en la línea celular cancerígena humana HeLa.

1.6 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* y analizar *in silico* el mecanismo de acción de derivados del ácido gálico, que se diseñen racionalmente, mediante un modelo QSAR.

1.7 OBJETIVOS PARTICULARES:

1.7.1 Computacionales

- Analizar *in silico* los derivados de ácido gálico con base en la actividad citotóxica mediante un análisis QSAR en la línea celular HeLa.

- Diseñar con ayuda del modelo un grupo de nuevos derivados de ácido gálico y cinámico.
- Realizar un *docking* molecular con los derivados AG y las moléculas de unión a tubulina en el sitio de la colchicina.

1.7.2 Experimentales

- Realizar la semi-síntesis de los derivados seleccionados del ácido gálico.
- Purificar los derivados obtenidos de la semi-síntesis.
- Elucidar estructuralmente a los derivados semi-sintetizados.
- Determinar el efecto citotóxico de los derivados del ácido gálico en la línea celular HeLa, obteniendo su IC₅₀.

1.8 REFERENCIAS

1. National Cancer Institute [NCI] [Internet]. 2021. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/>
2. American Cancer Society [ACS] [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cancer.org/>
3. World Health Organization [WHO]. 2020.
4. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Biryukov S, Brauer M, Cercy K, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1659–724.
5. WHO WHO. Noncommunicable diseases [Internet]. 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
6. IARC. CANCER TODAY [Internet]. 2020. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group
7. Marquina G, Manzano A, Casado A. Targeted Agents in Cervical Cancer: Beyond Bevacizumab. *Curr Oncol Rep*. 2018 May 1;20(5).
8. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008 Sep;110(3 SUPPL.2).
9. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. Vol. 12, *Public Health Genomics*. 2009. p. 281–90.
10. Fang J, Zhang H, Jin S. Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy. Vol. 35, *Tumor Biology*. Kluwer Academic Publishers; 2014. p. 5083–93.
11. Lea JS, Lin KY. Cervical Cancer. Vol. 39, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2012. p. 233–53.
12. Chen J, Gu W, Yang L, Chen C, Shao R, Xu K, et al. Nanotechnology in the management of cervical cancer. *Rev Med Virol*. 2015 Mar 1;25(S1):72–83.
13. Alldredge JK, Tewari KS. Clinical Trials of Antiangiogenesis Therapy in Recurrent/Persistent and Metastatic Cervical Cancer. *Oncologist*. 2016 May;21(5):576–85.
14. Crafton SM, Salani R. Beyond Chemotherapy: An Overview and Review of Targeted Therapy in Cervical Cancer. Vol. 38, *Clinical Therapeutics*. Excerpta Medica Inc.; 2016. p. 449–58.
15. Burjberg M, Beskow C, Kannisto P, Lindahl G. Cervixcancer eb klinisk utmaning [Internet]. *Läkartidningen*. 2015. Available from: <https://lakartidningen.se/klinik-och-vetenskap-1/artiklar-1/klinisk-oversikt/2015/12/cervixcancer-en-klinisk-utmaning/>
16. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013 May;35(3):473–85.
17. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72(3 S):962–70.
18. Malarkey DE, Hoenerhoff MJ, Maronpot RR. Carcinogenesis: Manifestation and Mechanisms. *Fundam Toxicol Pathol Third Ed*. 2018;83–104.
19. Klaunig JE, James E, Klaunig. An Introd to Interdiscip Toxicol [Internet]. 2020;97–110. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128136027000089>
20. Peters JM, Gonzalez FJ. OP-TOXS180187 272..276 _ Enhanced Reader.pdf. *Toxicol Sci*. 2018;2:272–6.
21. Coffman JA. Cell Cycle Development. *Dev Cell*. 2004;6:321–7.
22. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: Genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):115–28.
23. Gao S wei, Liu F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2019;20(6):467–75.
24. Poon RYC. Chapter 1 Oscillators, Cell Cycle Control: A System of Interlinking. In: *Cell Cycle Oscillators, Methods and Protocols*. 2016.
25. Schafer KA. The Cel Cycle: A Review. *Vet Pathol*. 1998;35:461–78.
26. Zubiaga AM. Foreword Special Issue Cell Cycle and Regulation. *Genes (Basel)*. 2020;11:1–3.
27. Lee JH, Berger JM. Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerasa II. *Genes (Basel)*. 2019;10(859):2–18.
28. Pack LR, Daigh LH, Meyer T. Putting the brakes on the cell cycle: mechanisms of cellular growth arrest. *Cell Biol*. 2019;30:106–13.
29. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.

30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
31. Cheng JH, Hung CF, Yang SC, Wang JP, Won SJ, Lin CN. Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxyalchalcones as cancer chemopreventive agents. *Bioorganic Med Chem*. 2008;16(15):7270–6.
32. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004;432(7015):332–7.
33. Hynes NE. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2000;2(3):154–7.
34. Merle P, De La Monte S, Kim M, Herrmann M, Tanaka S, Von Dem Bussche A, et al. Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(4):1110–22.
35. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Brazilian J Biol*. 2021;81(4):1133–43.
36. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Definitions*. 2020;20(3):175–93.
37. Lakhani CM, Benjamin M, Davis, Glen F, Rall MJS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Clin Oncol*. 2017;176(3):139–48.
38. Pistrutto G, Triscioglio D, Ceci C, Alessia Garufi, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(4):603–19.
39. Adams J, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324–37.
40. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432(7015):307–15.
41. Lewis-Wambi JS, Jordan VC. Estrogen regulation of apoptosis: How can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):1–12.
42. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019;39(1):1–17.
43. Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol*. 2010;20(1):14–24.
44. Infantes Esteban S. Una de las mejores terapias contra el cáncer: la Inmunoterapia. *Rev derecho, Empres y Soc*. 2016;9(2):93–106.
45. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004;23:2825–37.
46. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, et al. Mitotic Catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entail aneuploidy. *Oncogene*. 2004;23:4362–70.
47. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2011;12(6):385–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3115>
48. Mc Gee MM. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
49. Pollard TD, Goldman RD. Overview of the cytoskeleton from an evolutionary perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(7):1–7.
50. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463(7280):485–92.
51. Field JJ, Waight AB, Senter PD. A previously undescribed tubulin binder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(38):13684–5.
52. Seligmann J, Twelves C. Tubulin: An example of targeted chemotherapy. *Future Med Chem*. 2013;5(3):339–52.
53. Dráber P, Dráberová E. Dysregulation of microtubule nucleating proteins in cancer cells. *Cancers (Basel)*. 2021;13(22).
54. Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018;28(10):776–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001>
55. Zhang Y, Yang SH, Guo XL. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;96(44):659–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.041>
56. Naaz F, Haider MR, Shafi S, Yar MS. Anti-tubulin agents of natural origin: Targeting taxol, vinca, and colchicine binding domains. *Eur J Med Chem*. 2019;171:310–31.
57. Matthew S, Chen Q-Y, Ratnayake R, Farmaintt CS, Lucena-Agell D, Bonato F, et al. Gatorbulin-1, a distinct cyclodepsipeptide chemotype, targets a seventh tubulin pharmacological site. *Pharmacology*. 2021;118:1–11.
58. 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. *PNAS*. 2014;111:13817–21.
59. Brouhard GJ, Rice LM. Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*

- [Internet]. 2018;19(7):451–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0009-y>
60. Fojo AT, Menefee M. Microtubule targeting agents: Basic mechanisms of multidrug resistance (MDR). *Semin Oncol*. 2005;32(SUPPL. 7):3.
 61. Li W, Sun H, Xu S, Zhu Z, Xu J. Tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site: A perspective of privileged structures. *Future Med Chem*. 2017;9(15):1765–94.
 62. Weaver BA. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Perspect cell Biol Hum Heal*. 2014;25:26772681.
 63. Matsen CB, Neumayer LA. Breast cancer: A review for the general surgeon. *JAMA Surg*. 2013;148(10):971–9.
 64. Ramshaw BJ. Laparoscopic Surgery for Cancer Patients. *Cancer J Clin*. 1997;47:327–50.
 65. Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2010;41(4).
 66. Syrigou E, Triantafyllou O, Makrilia N, Kaklamanos I, Kotanidou A, Manolopoulos L, et al. Acute hypersensitivity reactions to chemotherapy agents: An overview. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2010;9(3):206–13.
 67. Livshits Z, Rao RB, Smith SW. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am*. 2014;32(1):167–203.
 68. Rizzuti AE. The Adverse Events of Chemotherapy for Retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(6):862.
 69. Benedí J, Gómez del Río MÁ. Fármacos antineoplásicos (I). *Farm Prof*. 2006;20(1):60–4.
 70. Sauter B, Gillingham D. DNA Damaging Agents in Chemical Biology and Cancer. *Chimia (Aarau)*. 2020;74(9):693–8.
 71. Puyo S, Montaudon D, Pourquier P. From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2014;89(1):43–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.07.006>
 72. Peters GJ, Van Der Wilt CL, Van Moorsel CJA, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther*. 2000;87(2–3):227–53.
 73. Parker WB. Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. *Chem Rev*. 2009;109(7):2880–93.
 74. Chen Y, Guan Y, Wang J, Ma F, Luo Y, Chen S, et al. Platinum-based chemotherapy in advanced triple-negative breast cancer: A multicenter real-world study in China. *Int J Cancer*. 2020;147(12):3490–9.
 75. Ciarimboli G. Anticancer platinum drugs update. *Biomolecules*. 2021;11(11):10–2.
 76. Chazin E de L, Reis R da R, Junior WTV, Moor LFE, Vasconcelos TRA. An overview on the development of new potentially active camptothecin analogs against cancer. *Mini Rev Med Chem*. 2014;14(12):953–62.
 77. Basili S, Moro S. Novel camptothecin derivatives as topoisomerase I inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(5):555–74.
 78. Ma L, Zhang M, Zhao R, Wang D, Ma Y, Ai L. Plant Natural Products : Promising Resources for. *Molecules*. 2021;26(4):933.
 79. Dutta S, Mahalanobish S, Saha S, Ghosh S, Sil PC. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019;128(February):240–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.012>
 80. Florian S, Mitchison TJ, Florian S, Mitchison TJ. Chapter 25 Anti-Microtubule Drugs. 2016;1413.
 81. Begam AJ, Jubie S, Nanjan MJ. ESTROGEN RECEPTOR AGONISTS / ANTAGONISTS IN BREAST CANCER THERAPY : A CRITICAL REVIEW. *Bioorg Chem* [Internet]. 2017;71:257–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.02.011>
 82. Student S, Hejmo T, Poterafa-hejmo A, Leśniak A, Buđak R. Anti-androgen hormonal therapy for cancer and other diseases. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2020;866. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172783>
 83. Gamat M, Mcneel DG. Androgen deprivation and immunotherapy for the traetmet of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(12):297–310.
 84. Xu P, Ye S, Li K, Huang M, Wang Q, Zeng S, et al. NOS1 inhibits the interferon response of cancer cells by S-nitrosylation of HDAC2. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):1–16.
 85. Vishwasrao P, Li G, Boucher JC, Smith DL, Hui SK. Emerging CAR T Cell Strategies for the Treatment of AML. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5):1–26.
 86. Vázquez A, Mendoza J. Células asesinas naturales con el receptor de antígeno quimérico (CAR-NK): terapia emergente contra el cáncer. 2021;11–24.
 87. Liang Q, Zhang EH, Yan G, Yang YZ, Liu WF, Liu XG. A lithium ion-imprinted adsorbent using magnetic carbon nanospheres as a support for the selective recovery of lithium ions. *Xinxing Tan Cailiao/New Carbon Mater* [Internet]. 2020;35(6):696–706. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1872-5805\(20\)60533-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-5805(20)60533-9)
 88. Ramos A, Sadeghi S, Tabatabaeian H. Battling chemoresistance in cancer: Root causes and strategies to uproot them. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.

89. Cervantes A. Resistencia a la quimioterapia: mecanismos y vías de modulación. 2018 [Internet]. 2018;1–7. Available from: <http://esteve.org/wp-content/uploads/2018/01/136676.pdf>
90. Zhang Q, Feng Y, Kennedy D. Multidrug-resistant cancer cells and cancer stem cells hijack cellular systems to circumvent systemic therapies, can natural products reverse this? Vol. 74, Cellular and Molecular Life Sciences. 2017. p. 777–801.
91. Talib WH, Alsalahat I, Daoud S, Abutayeh RF, Mahmod AI. Plant-Derived Natural Products in Cancer Research: Extraction, Mechanism of Action, and Drug Formulatio. *Molecules*. 2020;25(5319):1–89.
92. Aung TN, Qu Z, Kortschak RD, Adelson DL. Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. *Mol Sci*. 2017;18(656):1–20.
93. Ravelo ÁG, Braun AE. Relevancia De Los Productos Naturales En El Descubrimiento De Nuevos Fármacos En El S. Xxi. *CiencExactFisNat (Esp)*. 2009;103(2):409–19.
94. AL Zahrani NA, El-Shishtawy RM, Asiri AM. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2020;204:112609. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>
95. Kanakkanthara A, Wilmes A, O’Brate A, Escuin D, Chan A, Gjyzezi A, et al. Peloruside- and laulimalide-resistant human ovarian carcinoma cells have β -tubulin mutations and altered expression of β II- and β III-tubulin isotypes. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(8):1419–29.
96. Prota AE, Danel F, Bachmann F, Bargsten K, Buey RM, Pohlmann J, et al. The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J Mol Biol [Internet]*. 2014;426(8):1848–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.005>
97. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents*. 2002;2(1):1–17.
98. Kondoh M, Usui T, Kobayashi S, Tsuchiya K, Nishikawa K, Nishikiori T, et al. Cell cycle arrest and antitumor activity of pironetin and its derivatives. *Cancer Lett*. 1998;126(1):29–32.
99. Usui T, Watanabe H, Nakayama H, Tada Y, Kanoh N, Kondoh M, et al. The Anticancer Natural Product Pironetin Selectivity Targets Lys352 of α -Tubulina. *Chemistry Biol*. 2004;11:799–806.
100. Ravelli RBG, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. 2004;428(6979):198–202.
101. Pettit GR, Rhodes MR, Herald DL, Hamel E, Schmidt JM, Pettit RK. Antineoplastic agents. 445. Synthesis and evaluation of structural modifications of (Z)- and (E)-combretastatin A-4. *J Med Chem*. 2005;48(12):4087–99.
102. Tron GC, Pirali T, Sorba G, Pagliai F, Busacca S, Genazzani AA. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *ChemInform*. 2006;37(34).
103. Hura N, Sawant A V., Kumari A, Guchhait SK, Panda D. Combretastatin-Inspired Heterocycles as Antitubulin Anticancer Agents. *ACS Omega*. 2018;3(8):9754–69.
104. AECC. Estudio del mecanismo de acción de una nueva familia de agentes antitumorales. 2018;1–49.
105. Aguilar-Zárate P, Cruz-Hernández MA, Montañez JC, Belmares-Cerda RE, Aguilar CN. Bacterial Tannases: Production, Properties and Applications. *Rev Mex Ing Qum*. 2014;13(1):63–74.
106. Treviño-Cueto B, Luis M, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez R, Aguilera A, Aguilar CN. Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). *Bioresour Technol*. 2007;98(3):721–4.
107. Albini A, Noonan DM, Ferrari N. Molecular pathways for cancer angioprevention. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15):4320–5.
108. Bin-Chuan JI, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, et al. Gallic Acid Induces Apoptosis via Caspase-3 and Mitochondrion-Dependent Pathways in Vitro and Suppresses Lung Xenograft Tumor Growth in Vivo <http://pubs.acs.org>. *J Agric Food Chem*. 2009;57(16):7596–604.
109. Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Pharmacology [Internet]*. 2010;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
110. Silverman RB, Holladay W. The organic chemistry of drug desing and drug action. 2015.
111. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Mirzaei S, Hashemi F, Samarghandian S, Zabolian A, et al. Gallic acid for cancer therapy: Molecular mechanisms and boosting efficacy by nanoscopical delivery. *Food Chem Toxicol*. 2021;157(112576).
112. Cui H, Yuan J, Du X, Wang M, Yue L, Liu J. Ethyl gallate suppresses proliferation and invasion in human breast cancer cells via Akt-NF- κ B signaling. *Oncol Rep*. 2015 Mar 1;33(3):1284–90.
113. Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespón C, Villar ML, Nocito M, et al. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys*. 1998;350(1):49–54.

114. Sánchez-Carranza JN, Alvarez L, Marquina-Bahena S, Salas-Vidal E, Cuevas V, Jiménez EW, et al. Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*. 2017;22(4).
115. Sánchez-Carranza JN, Díaz JF, Redondo-Horcajo M, Barasoain I, Alvarez L, Lastres P, et al. Gallic acid sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells through an increase in reactive oxygen species and subsequent downregulation of ERK activation. *Oncol Rep*. 2018;39(6):3007–14.
116. Escalona-Arranz JC, Carrasco-Velaz R, Padrón-García JA. Introducción al diseño racional de fármacos. 2008. 1–45 p.
117. 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 [Internet]*. 2014;77:422–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.018>
118. Prada-Gracia D, Huerta-Yépez S, Moreno-Vargas LM. Aplicación de métodos computacionales para el descubrimiento, diseño y optimización de fármacos contra el cáncer. *Bol Med Hosp Infant Mex [Internet]*. 2016;73(6):411–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhix.2016.10.006>
119. Hopfinger AJ. Computer-Assisted Drug Design. *J Med Chem*. 1985;28(9):1133–9.
120. Jorgensen WL. The Many Roles of Computation in Drugs Discovery. *Science (80-)*. 2004;303(5665):1813–8.
121. Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, Cronin M, et al. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? *J Med Chem*. 2014;57(12):4977–5010.
122. Hamzeh-Mivehroud M, Sokouti B, Dastmalchi S. Molecular Docking at a Glance. In: *Methods and Algorithms for Molecular Docking-Based Drug Design and Discovery*. 2016. p. 1–38.
123. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design. Curr Comput Aided Drug Des [Internet]*. 2011;7(2):146–57. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cad/2011/00000007/00000002/art00008%0Ahttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
124. Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2003;32:335–73.
125. McConkey BJ, Sobolev V, Edelman M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Curr Sci*. 2002;83(7):845–56.
126. Aguirre Valderrama A. Grupo de Modelización y Diseño Molecular Departamento de Química Orgánica Facultad de Ciencias. 2009. 278 p.
127. Trejo-Muñoz CR. Evaluación teórica y experimental de una serie de isoindolinas como agentes antitumorales. Instituto Politécnico Nacional; 2009.
128. Meza Menchaca T, Juárez-Portilla C, C. Zepeda R. Past, Present, and Future of Molecular Docking. *Drug Discov Dev - New Adv*. 2020;1–13.
129. Khanna V, Ranganathan S, Petrovsky N. Rational structure-based drug design [Internet]. Vols. 1–3, *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*. Elsevier Ltd.; 2018. 585–600 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20275-6>

CAPÍTULO II

Análisis QSAR y diseño de nuevos derivados de ácido gálico (AG)

Es este capítulo abordaremos los detalles para la generación del modelo QSAR, así como la propuesta y el diseño de nuevos derivados de ácido gálico con efecto citotóxico en la línea celular Hela.

2.1 DETALLES COMPUTACIONALES

2.1.1 Búsqueda de moléculas y diseño molecular

Se realizó una búsqueda de moléculas que presentaran el motivo del anillo aromático en su estructura; además que reportaran actividad citotóxica experimental en la línea celular HeLa, a través del IC_{50} obtenido por el ensayo colorimétrico MTT.^{1,2,11-13,3-10} A partir de esta búsqueda se identificaron un total de 170 moléculas que cumplían los criterios propuestos. Sin embargo, 30 moléculas fueron excluidas del estudio porque su valor de IC_{50} estaba por debajo del rango micromolar, que puede presentar fuertes efectos secundarios. Lo anterior tomando en cuenta que la Sociedad Americana del Cáncer, menciona que no todos los fármacos utilizados en quimioterapia pueden diferenciar entre las células cancerosas y normales; por lo tanto, son citotóxicos para ambas poblaciones celulares, lo que da lugar a efectos secundarios. Estos efectos aumentan cuando se utilizan compuestos con valores de IC_{50} muy bajos.^{14,15}

Las 140 moléculas finales (figura 2.1) se construyeron utilizando el software SPARTAN'18.¹⁶ Posteriormente, se realizó un análisis conformacional para obtener el conformador de equilibrio (conformador de menor energía), mediante la teoría de mecánica molecular con el campo de fuerza Sybyl, analizando 10,000

conformadores. A continuación, se optimizó la geometría estructural de estas moléculas -mediante el método semiempírico PM6 (*parametric method number 6*).¹⁷ Finalmente, para corroborar que las estructuras se encuentran en un mínimo en la superficie de energía potencial se realizó el cálculo de sus frecuencias vibracionales (IR).

2.1.2 Cálculo de descriptores moleculares

A partir de las estructuras optimizadas de las moléculas, se obtuvieron un total de 298 descriptores moleculares; estos se agruparon en ocho familias (tabla 2.1). Se obtuvieron siete familias de descriptores con el programa DRAGON V5.4¹⁸ y una con SPARTAN'18. En resumen, las familias de descriptores constitucionales,¹⁹ fragmentos centrados en átomos y topológicos nos ayudaron a caracterizar de manera sencilla los aspectos estructurales de la molécula: tipo de átomos, distribución y conectividad. Mientras que las familias geométrica, mecánica cuántica, descriptores de carga y descriptores de propiedades moleculares nos dan el tamaño, la forma y el posible modo de interacción con el objetivo biológico.²⁰

Tabla 2.1 Descriptores moleculares usados durante la construcción del modelo QSAR.

Familia y Dimensión de los descriptores	Descriptores moleculares	Programa
Constitucionales (0D)	MW, AMW, Sv, Se, Sp, Ss, Mv, Me, Mp, Ms, nAT, nSK, nBT, nBO, nBM, SCBO, ARR, nCIC, nCIR, RBN, RBF, nDB, nAB, nH, nC, nN, nO, nS, nF, nCL, nX, nR05, nR06, nR09, nR10, nBnz.	Dragon
Conteo de grupos funcionales (1D)	nCp, nCs, nCt, nCrs, nCrt, nCar, nCbH, nCb, nCconj, nR=Cs, nR=Ct, nRCOOH, nRCOOR, nArCOOR, nArCONHR, nRCO, nArCO, nN=C-N<, nArC=N, nRNH2, nArNH2, nArNR2, nN+, nArNO2, nC=N-N<, nROH, nArOH, nOHp, nOHs, nOht, nROR, nArOR, nRSR, nCRX3, nArX, nPyrroles, nThiophenes, nPyridines, nHDon, nHAcc, nHBonds.	Dragon
Fragmentos Centrados en Átomos (1D)	C-001, C-002, C-003, C-005, C-006, C-007, C-008, C-009, C-011, C-013, C-014, C-016, C-017, C-024, C-025, C-026, C-028, C-033, C-034, C-037, C-038, C-039, C-040, H-046, H-047, H-048, H-049, H-050, H-051, H-052, H-053, O-056, O-057, O-058, O-059, O-060, O-061, N-066, N-069, N-071, N-072, N-073, N-074, N-075, N-076, F-083, F-084, F-085, Cl-089, S-107.	Dragon
Topológicos (2D)	ZM1, ZM1V, ZM2, ZM2V, Qindex, SNar, HNar, GNar, Xt, Dz, Ram, Pol, LPRS, VDA, MSD, SMTI, SMTIV, GMTI, GMTIV, Xu, SPI, W, WA, Har, Har2, QW, TI1, TI2, STN, HyDp, RHyDp, w, ww, Rww, D/D, Wap, WhetZ, Whetm, Whetv, Whete, Whetp, J, JhetZ, Jhetm, Jhetv, Jhete, Jhetp, MAXDN, MAXDP, DELS, TIE, S0K, S1K, S2K, S3K, PHI, BLI, PW2, PW3, PW4, PW5, PJI2, CSI, ECC, AECC, DECC, MDDD, UNIP, CENT, VAR, BAC, Lop, ICR, D/Dr05, D/Dr06, D/Dr09, D/Dr10, T(N..N), T(N..O), T(N..S), T(N..F), T(N..Cl), T(O..O), T(O..S), T(O..F), T(O..Cl), T(S..F), T(F..F), T(F..Cl), T(Cl..Cl).	Dragon
Geométricos (3D)	W3D, J3D, H3D, AGDD, DDI, ADDD, G1, G2, RGyr, SPAN, SPAM, MEcc, SPH, ASP, FDI, PJI3, L/Bw, SEig, HOMA, RCI, AROM, HOMT, DISPm, QXXm, QYYm, QZZm, DISPv, QXXv, QYYv, QZZv, DISPe, QXXe, QYYe, QZZe, DISPp, QXXp, QYYp, QZZp, G(N..N), G(N..O), G(N..S), G(N..F), G(N..Cl), G(O..O), G(O..S), G(O..F), G(O..Cl), G(S..F), G(F..F), G(F..Cl), G(Cl..Cl).	Dragon
Mecánica Cuántica (3D)	E HOMO (KJ/mol), E LUMOL (KJ/mol), dipole, hardness and ovality	SPARTAN'18

Carga	Qpmax, qnmax, Qpos, Qneg, Qtot, Qmean, Q2, RPCG, RNCG, SPP, TE1, TE2, PCWTe, LDI.	Dragon
Propiedades Moleculares	Ui, Hy, AMR, TPSA(NO), TPSA(Tot), MLOGP, MLOGP2, ALOGP, ALOGP2.	Dragon

2.1.3 Generación del modelo QSAR

Para construir el modelo matemático se utilizó MobyDigs;²¹ este programa utiliza la técnica del algoritmo genético para el cálculo de modelos de regresión que determinan la relación entre una variable dependiente ($Y = \textit{Actividad biológica}$) respecto a otras variables independientes ($X = \textit{Descriptores moleculares}$). Se asignó como variable dependiente (Y) la citotoxicidad (μM) en la línea celular HeLa. Se probaron diferentes transformaciones matemáticas sobre Y ($\frac{1}{Y}$, $\text{Log}Y$, y $\text{Log}(\frac{1}{Y})$) para el análisis de algoritmos genéticos, con el fin de encontrar la que asegura una mayor correlación. La mejor transformación encontrada fue $\text{Log}Y$, ayudándonos a normalizar y tener una mejor perspectiva gráfica de nuestros datos, enteros de 1 a 900 μM . Para el modelo final se aplicó otra transformación, cambiamos el dato biológico ($\text{Log}Y$) por el valor de la diferencia obtenida de comparar el $\text{Log}Y$ de cada compuesto con el que corresponde al ácido gálico ($\Delta\text{Log}Y = \text{Log}Y_i - \text{Log}Y_{\text{Ácido gálico}}$); de la misma manera que se hizo con los descriptores moleculares finales (anexo capítulo II, tabla 2.1S, 2.2S). Es importante mencionar que la generación del modelo se realizó a través de dos categorías de moléculas: las

utilizadas para la fase de entrenamiento y las otras utilizadas en la fase de validación. En la fase de entrenamiento se lleva a cabo la generación de los modelos QSAR, mediante la combinación de diferentes descriptores moleculares (298 para nuestro estudio) hasta conseguir una buena correlación con la actividad biológica (valor R^2). En la fase de validación, se evaluó la capacidad de predicción del modelo final (Q^2 y Q_{ext}^2), seleccionando al azar el 30% de las moléculas y prediciendo sus valores experimentales, este procedimiento se realizó al menos cinco veces.

2.1.4 Validación del modelo QSAR

Para la validación del modelo QSAR se emplearon los siguientes parámetros estadísticos: Test de Fisher (**F**), desviación estándar (**s**), coeficiente de determinación (R^2), coeficiente de determinación ajustado (R_{adj}^2), regla QUIK, reglas de redundancia (R^P) y de sobreajuste (R^N).²² Para la capacidad de predicción del modelo se consideraron diferentes parámetros estadísticos, como el coeficiente de correlación Q_{LOO}^2 , la regla asintótica Q2 (Q_{ASYM}^2), el bootstrap (Q_{BOOT}^2), las técnicas de *Y-scrambling* ($a(R^2)$) y $a(Q^2)$ y la validación externa (Q_{EXT}^2). Todos los detalles matemáticos de estas reglas y parámetros estadísticos se muestran en la sección suplementaria.^{23,24}

2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.2.1 Modelo QSAR

La búsqueda bibliográfica arrojó un total de 140 moléculas (figura 2.1) con las características de nuestro interés y con valores de IC₅₀ en el rango de 1- 877.8 μM, seis moléculas fueron excluidas. Estas seis moléculas se eliminaron del modelo debido a que presentaban valores atípicos (*outliers*), es decir, estadísticamente eran diferentes al resto de las moléculas. De acuerdo con el grupo de Jana, si el valor residual de la diferencia entre la actividad biológica y la predicha excede dos veces la desviación estándar, pueden ser considerados como moléculas *outliers*. El modelo QSAR consta de 14 variables, perteneciente a seis familias de descriptores, y se muestra a continuación junto con sus parámetros estadísticos.

$$\begin{aligned} \Delta \log IC_{50} = & 0.13639736 \pm 0.45 \Delta S v - 0.14600261 \pm 0.032 \Delta n A T - 0.5092434 \pm 0.048 \Delta n R 06 \\ & + 0.39477929 \pm 0.052 \Delta J 3 D + 0.1304392 \pm 0.012 \Delta A D D D - 0.19552034 \\ & \pm 0.037 \Delta S P A N + 1.71481976 \pm 0.269 \Delta H O M A + 1.2584266 \pm 0.094 n R C O O H \\ & - 0.53392036 \pm 0.041 n A r C O O R + 1.45769435 \pm 0.160 n A r C \\ = & N + 0.10326459 \pm 0.030 \Delta O - 057 - 0.02443551 \pm 0.018 \Delta T E 2 - 0.07491675 \\ & \pm 0.034 \Delta M L O G P + 0.01755769 \pm 0.005 \Delta M L O G P 2 - 0.044668 \\ & \pm 0.021. \qquad \qquad \qquad E c. (1) \end{aligned}$$

$$R^2 = 0.76 \quad S = 0.32 \quad F = 19.02 \quad R^N = -0.033$$

$$R_p = 0.0074 \quad Q^2 = 0.69 \quad Q_{ext}^2 = 0.62 \quad \Delta Q = 0.0152$$

$$Q_{boot}^2 = 0.65 \quad a(R^2) = 0.075 \quad a(Q^2) = -0.186$$

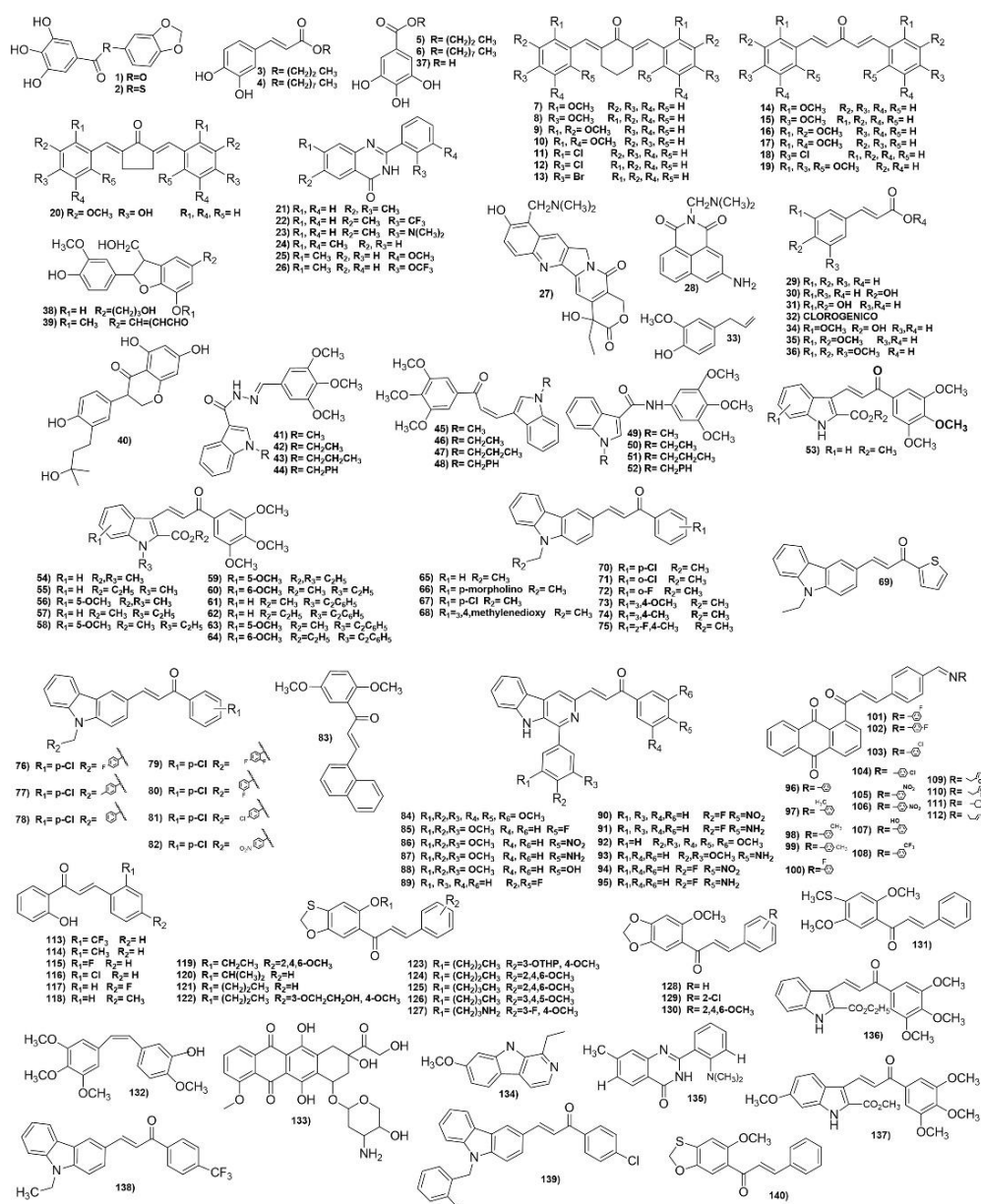


Figura 2.1. Estructura de los compuestos aromáticos utilizados en los modelos QSAR

Los valores correspondientes a los descriptores moleculares empleados en la generación de la ecuación QSAR se presentan en la tabla 2.2S (anexo capítulo II).

Mientras que en la tabla 2.3S (anexo capítulo II) se presentan las actividades experimentales (Y_{exp}) y predichas (Y_{pred}), también se muestran los valores de apalancamiento (Hat) y el error predicho (Err_{Pred}). Este último es el resultado de la diferencia entre Y_{exp} en relación con Y_{pred} y se presentan mediante el $Residual_{pred}$ ($Y_{exp} - Y_{pred}$).

El dominio de aplicabilidad de nuestro modelo se evaluó mediante su gráfico Williams, generado con el promedio de cinco experimentos en los cuales se obtuvieron valores similares para los parámetros estadísticos. En la figura 2.2S se presenta este gráfico de Williams, nos muestra el dominio de aplicabilidad de nuestro QSAR basado en los residuos de predicción y los valores de apalancamiento, se pueden identificar los compuestos estructuralmente diferentes ($h > h^*$; $h^* = 3h$) y los valores atípicos de la respuesta ($Residual_{pred} > 3SDEC$). Los compuestos fuera del recuadro negro se identifican como valores atípicos (figura 2.2). Estas líneas representan el apalancamiento de advertencia (h^* , línea horizontal) y tres veces la desviación estándar en el error de cálculo (SDEC, líneas verticales). Seis moléculas (**2**, **4**, **5**, **27**, **40** y **133**) quedaron fuera del dominio de aplicabilidad del modelo. Por lo tanto, el modelo no puede aplicarse para la

predicción de la actividad citotóxica de nuevos compuestos aromáticos con alta similitud estructural a estos seis compuestos.

Las moléculas **27** y **133** son más complejas estructuralmente, con valores altos para **nR06**, **ΔS_v** , **ΔnAT** , y **$\Delta ADDD$** . En el caso de las moléculas **2**, **4**, **5** y **40** a pesar de no ser tan complejas, tienen grupos OH (**0 – 057**) en sus anillos aromáticos. Según nuestro estudio, la presencia de grupos OH afecta la actividad citotóxica de los compuestos. Esta característica aumenta especialmente la polaridad de la molécula **5**. Mientras que las moléculas **2** y **4** tienen altos valores de **$\Delta J3D$** con respecto a las demás, lo que se debe al tamaño, la forma y la distancia de las ramas. Finalmente, las moléculas **27**, **40** y **133** presentan los valores más altos para **$\Delta TE2$** , lo cual indica que los átomos de estos compuestos tienen interacciones electrónicas intramoleculares que pueden afectar su ionización y polaridad.

La figura 2.2 nos ayudó a determinar la adecuada capacidad predictiva de nuestro modelos QSAR ($\text{Log IC}_{50\text{cal}}$ vs. $\text{Log IC}_{50\text{Exp}}$), la cual fue determinada a través de cinco experimentos (figura 2.2 y figura 2.3S, anexo capítulo II), en los cuales se obtuvieron valores similares para los parámetros estadísticos de Q^2 y Q_{ext}^2 .

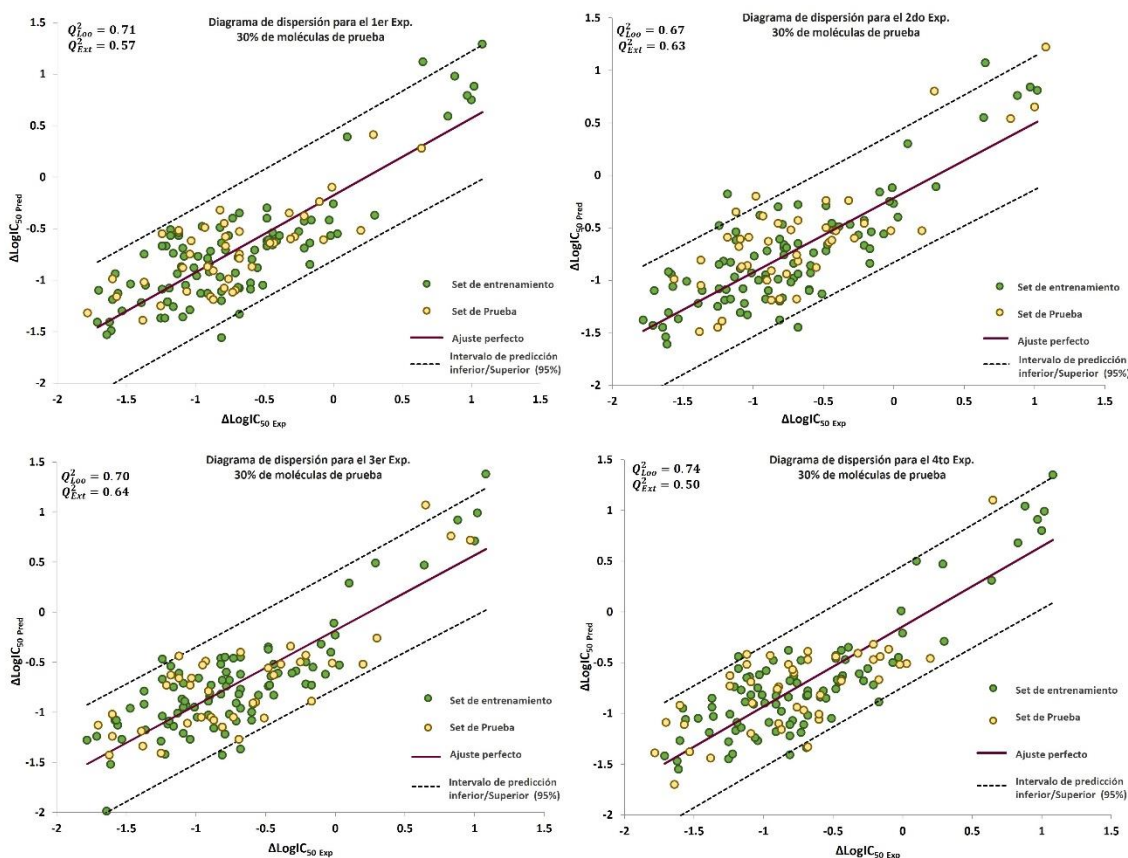


Figura 2.2. Habilidad predictiva del modelo QSAR (Log IC₅₀Pred vs. Log IC₅₀Exp)

En la ecuación QSAR (ecuación 1) los primeros tres descriptores son constitucionales; **nAT** es el número total de átomos en la molécula; **nR06** se refiere al número de anillos de 6 miembros y **Sv** es la suma de los volúmenes atómicos de Van Der Waals (a escala de átomo de carbono).

El valor del descriptor **Sv** se obtiene de la siguiente manera:

$$Sv = \sum_{i=1}^A V_i \quad (\text{ec. 2})$$

Donde V_i es el volumen de Van Der Waals del i -ésimo átomo.²⁵ Según el modelo QSAR, este descriptor afecta negativamente a la actividad biológica. Esto es congruente ya que el valor de Sv está relacionado con el efecto estérico de los compuestos; ya que al aumentar de volumen la farmacocinética y la farmacodinámica de estos se ven afectadas. En cuanto a la farmacocinética, la afectación se genera debido a que a un compuesto con un mayor volumen le será más difícil atravesar las barreras biológicas; respecto a la farmacodinámica la interacción con la diana biológica puede minimizarse o incluso perderse.

Mientras que los descriptores **nAT**, y **nR06** tienen una contribución positiva en la actividad citotóxica, esta contribución está asociada al efecto estérico, el aumento del tamaño y volumen de los compuestos; ya que estas características podrían orientarlos adecuadamente a su sitio de unión, generando interacciones con los aminoácidos aromáticos.

Cabe mencionar que la combinación de la información de estos descriptores nos orienta en el diseño racional de compuestos citotóxicos, debido a que nos propone aumentar el número de átomos en los nuevos derivado de AG, en particular anillos de seis miembros, o átomos de pequeño volumen, evitando la penalización de Sv .

Los cuatro descriptores siguientes son de tipo geométrico, empezando por **SPAN** que corresponde al parámetro $span R$ definido como el radio de la esfera

más pequeña, situada en el centro de masa, que encierra completamente todos los átomos de una molécula:

$$R = \max_i(r_i) \quad (\text{ec. 3})$$

Donde r_i = Distancia del i -ésimo átomo del centro de masa.²⁵

ADDD corresponde a la distancia media/grado de distancia, asociada a la matriz geométrica G y a la matriz de distancia de la molécula.²⁶

$$ADDD = \frac{1}{A} \cdot \sum_{i=1}^A \sum_{j=1}^A \frac{r_{ij}}{d_{ij}} \quad (\text{ec. 4})$$

Donde r_{ij} corresponde a la distancia geométrica y d_{ij} a la distancia topológica.

J3D se refiere al índice 3D-Balaban asociado a la matriz geométrica G o matriz de distancia geométrica de una molécula, y se calcula de la siguiente manera:

$$J3D \text{ or } {}^{3D}J = IB(G) = \frac{B}{C + 1} \cdot \sum_b ({}^G\sigma_i \cdot {}^G\sigma_j)^{-1/2} \quad (\text{ec. 5})$$

Donde IB es el operador Ivanciuc-Balaban. C es el número ciclomático (Número de anillos), mientras que $C + 1$ es el factor de normalización respecto al número de anillos en la molécula. B es el número de enlaces en el gráfico molecular. Finalmente, ${}^G\sigma_i$ y ${}^G\sigma_j$ son el grado de distancia geométrica de los dos vértices incidentes con el enlace b .²⁶

HOMA se refiere al Modelo de oscilador armónico del índice de aromaticidad;²⁷ se considera el grado de alternancia de los enlaces simples/dobles, midiendo las desviaciones de la longitud del enlace respecto a las longitudes óptimas del estado aromático típico:

$$HOMA = 1 - \frac{\sum_k \alpha_k \cdot \sum_{b=1}^{B_{\pi k}} (r_k^{opt} - r_b)^2}{B_{\pi}} \quad (ec. 6)$$

Donde la primera suma corre sobre cada k -ésimo tipo de enlace aromático. $B_{\pi k}$ es el número de las contribuciones de enlace tipo π consideradas del k -ésimo tipo de enlace aromático. La longitud de enlace real es r_b ; mientras que la longitud de enlace aromático típica referida al k -ésimo tipo de enlace aromático es r_k^{opt} . α_k es una constante numérica y el número total de enlaces aromáticos está representado por B_{π} .

De acuerdo con el modelo QSAR, el descriptor *SPAN* tiene una contribución positiva a la citotoxicidad asociada a la forma y al efecto estérico que podría permitir la orientación adecuada de la molécula y su diana biológica, favoreciendo la farmacodinámica de las moléculas. Para este caso, se prefieren moléculas flexibles, de mayor tamaño e hidrofóbicas, ya que su relación mínima - que encierra todos los átomos desde el centro de masa- es mayor debido a la contracción hidrofóbica estructural. En el mismo contexto, el *ADDD* recopila información sobre el plegamiento molecular; de hecho, en estructuras altamente plegadas, tiende a ser pequeño ya que las distancias interatómicas son menores;

mientras que las distancias topológicas aumentan a medida que el tamaño de la estructura aumenta.^{28,29} Según nuestro modelo, los valores más bajos de *ADDD* son la mejor opción para el diseño de nuevos compuestos citotóxicos, ya que estos valores reducirán la penalización de este descriptor respecto a la actividad biológica.

El descriptor *J3D* es sustancialmente independiente del tamaño de la molécula y del número de anillos,³⁰ ya que es menor para las moléculas con mayor número de ramificaciones. Por lo tanto, se prefieren las moléculas más ramificadas para nuestro diseño

El termino *HOMA* también tiene una contribución negativa a la actividad biológica de acuerdo con el QSAR, *HOMA* está asociado a efectos electrónicos que modifican la aromaticidad de la molécula, aumentando su valor en relación con la perturbación del estado aromático estándar para cada tipo de enlace. Por lo tanto, se prefieren los sistemas de estado aromático estable para nuestras moléculas. Este descriptor puede estar relacionado con la polaridad y la solvatación de las moléculas, influyendo en el cruce de las membranas celulares y en la interacción con la diana biológica, alterando la farmacocinética. En cuanto a la farmacodinámica de las moléculas, esta se podría ver afectada debido a las interacciones π - π o catión- π con residuos aromáticos o cargados.

Los tres descriptores siguientes **-nArCOOR**, **nArC = N** y **nRCOOH** pertenecen a la familia de recuentos de grupos funcionales y se refieren al número

de estos grupos funcionales dentro de las moléculas de interés, es decir, **nArCOOR** es el número de ésteres aromáticos, **nArC = N** es el número de iminas aromáticas y **nRCOOH** indica el número de ácidos carboxílicos. Brevemente, según el QSAR, *nArCOOR* tiene una contribución positiva a la actividad biológica porque este grupo funcional disminuye la polaridad de las moléculas, aumentando su lipofilia, lo que les permite atravesar las barreras hidrofóbicas e interactuar con su diana molecular, favoreciendo la farmacocinética de las moléculas. Por el contrario, *nRCOOH* tiene una contribución negativa a la actividad biológica, esto se debe a su alta polaridad, complicando el cruce a través de las barreras biológicas hidrofóbicas. En el caso de *nArC = N*, su contribución negativa está asociada al efecto estérico de estos grupos, que están presentes en un fragmento molecular en muchos compuestos (79-95). Este fragmento es el dibenzopirrol, un sistema heterocíclico de tres anillos, que podemos asociar a problemas de forma y estéricos de las moléculas que los tienen.

La siguiente familia de descriptores presentes en nuestro modelo es la correspondiente a los fragmentos centrados en átomos, representada por el descriptor que **0 – 057**. Esta familia de descriptores moleculares se define como el número de tipos específicos de átomos en una molécula y se calculan teniendo en cuenta la composición molecular, las hibridaciones y las conexiones de los átomos. **0 – 057**, implica el número de OH asociados al Fenol/Enol/Carboxilo. La contribución negativa del *0 – 057* en nuestro modelo se asocia a un aumento de la

polaridad de las moléculas, es decir, afecta a la farmacocinética de los compuestos al dificultar su paso por las barreras hidrofóbicas y ejercer así su acción biológica.

Posteriormente, los descriptores de las propiedades moleculares encontrados en el modelo son **MLOGP** y **MLOGP2**, que representan el coeficiente de partición octanol-agua de Moriguchi ($\log P$) y el coeficiente de partición octanol-agua de Moriguchi al cuadrado ($\log^2 P$) respectivamente. La contribución positiva de *MLOGP* en el modelo QSAR indica que el aumento de la hidrofobicidad de las moléculas favorecerá su farmacocinética, permitiéndoles atravesar las barreras hidrofóbicas. Sin embargo, la contribución negativa de *MLOGP2* indica que aumentar demasiado la hidrofobicidad disminuye su actividad biológica, ya que las moléculas pueden tener baja solubilidad y quedar retenidas en las membranas celulares, afectando a la interacción con su diana biológica. La presencia de la relación parabólica de *MLOGP* con la actividad citotóxica de estos compuestos es muy interesante, ya que esto indica la importancia del carácter lipofílico de los compuestos en su farmacocinética.^{31,32}

El último descriptor del modelo es **TE2**, descriptor electrónico topológico, se restringe a todos los pares $i - j$ de átomos enlazados, conectando los parámetros de polaridad submolecular con la topografía molecular expresada por las distancias interatómicas.²⁵

$$TE2 \text{ or } cT^E = \sum_{b=1}^B \left(\frac{|q_i - q_j|}{r_{ij}^2} \right)_b \quad (\text{ec. 7})$$

Donde q son las cargas atómicas parciales, r_{ij} son las distancias interatómicas y B es el número de enlaces. Este último descriptor tiene una contribución positiva en el modelo QSAR asociado a los efectos electrónicos debido a su influencia en la ionización y polaridad de una molécula, lo que podría facilitar el cruce de las membranas celulares e interactuar adecuadamente con el receptor.

2.2.2 Diseño de derivados quiméricos gálicos y cinámicos basado en el ligando N1-N9

La información proporcionada por nuestro modelo QSAR (ec. 1) mostró que para lograr una mejor actividad citotóxica de los derivados de AG en la línea celular HeLa, es necesaria la presencia de ésteres aromáticos ($nArCOOR$), anillos de 6 miembros ($nR06$), y un aumento del número de átomos (nAT) y de la lipofilia ($MLOGP$) de las moléculas. Además, la búsqueda de moléculas plegadas ($ADDD$) y restringidas conformacionalmente ($SPAN$) son uno de los objetivos de este diseño. Por ello, los derivados propuestos son ésteres aromáticos con metilaciones en el motivo galoilo -para aumentar nAT , $nArCOOR$, $SPAN$ y $MLOGP$ – lo que mejorará su actividad biológica (figura 2.3).

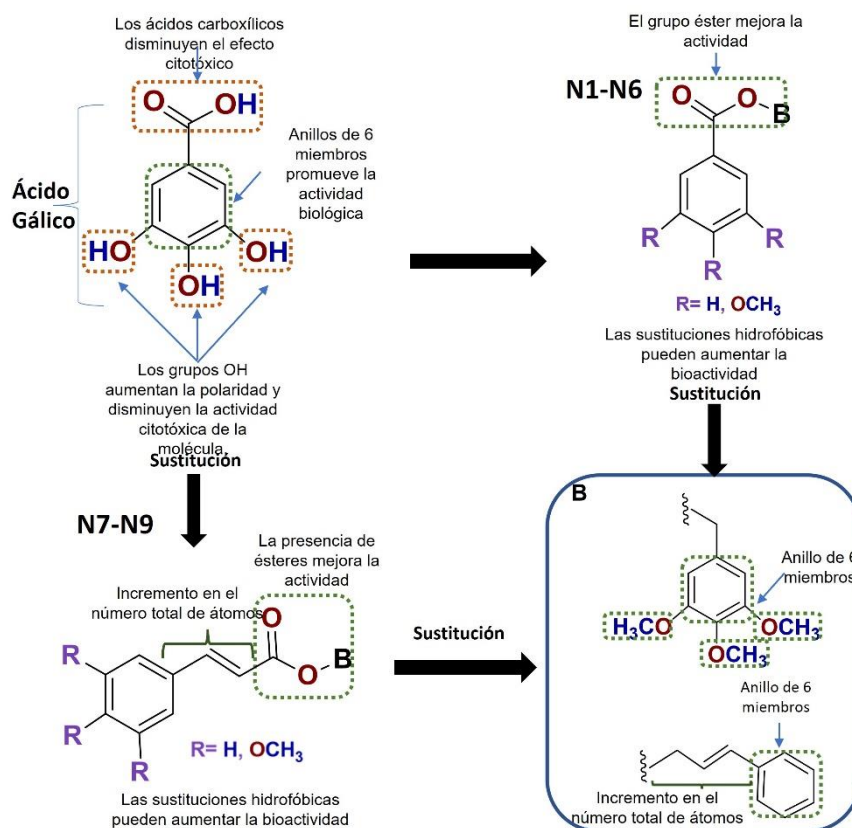


Figura 2.3. Estrategia de diseño de nuevos derivados de AG.

La presencia de grupos éster, anillos de 6 miembros y un aumento moderado del número total de átomos, mejoran la actividad citotóxica.

En el caso de los derivados **N3** y **N4** (figura 2.4), se proponen con el interés de mejorar la actividad respecto a sus análogos los galatos etílicos, evaluando el efecto de las metilaciones sobre las propiedades electrónicas ($\Delta HOMA$ y $\Delta TE2$), estéricas ($\Delta ADDD$, $\Delta J3D$, y $\Delta SPAN$) y lipofílicas ($\Delta MLOGP$) del anillo aromático. Según el QSAR, el grupo hidroxilo ($O - 057$) en el anillo aromático afecta a la lipofilia y disminuye la actividad. Además, esta modificación aumenta el nAT , el $SPAN$ y el $MLOGP$. Por último, los compuestos **N7-N9** (figura 2.4) se proponen porque el aumento de anillos de 6 miembros ($nR06$), la cadena de enlace de

carbono (*nAT*) y las metilaciones (eliminación de *O* – 057) en el anillo aromático mejorarán el efecto citotóxico, además estas modificaciones aumentan los valores de *MLOGP*, *SPAN* y *TE2*.

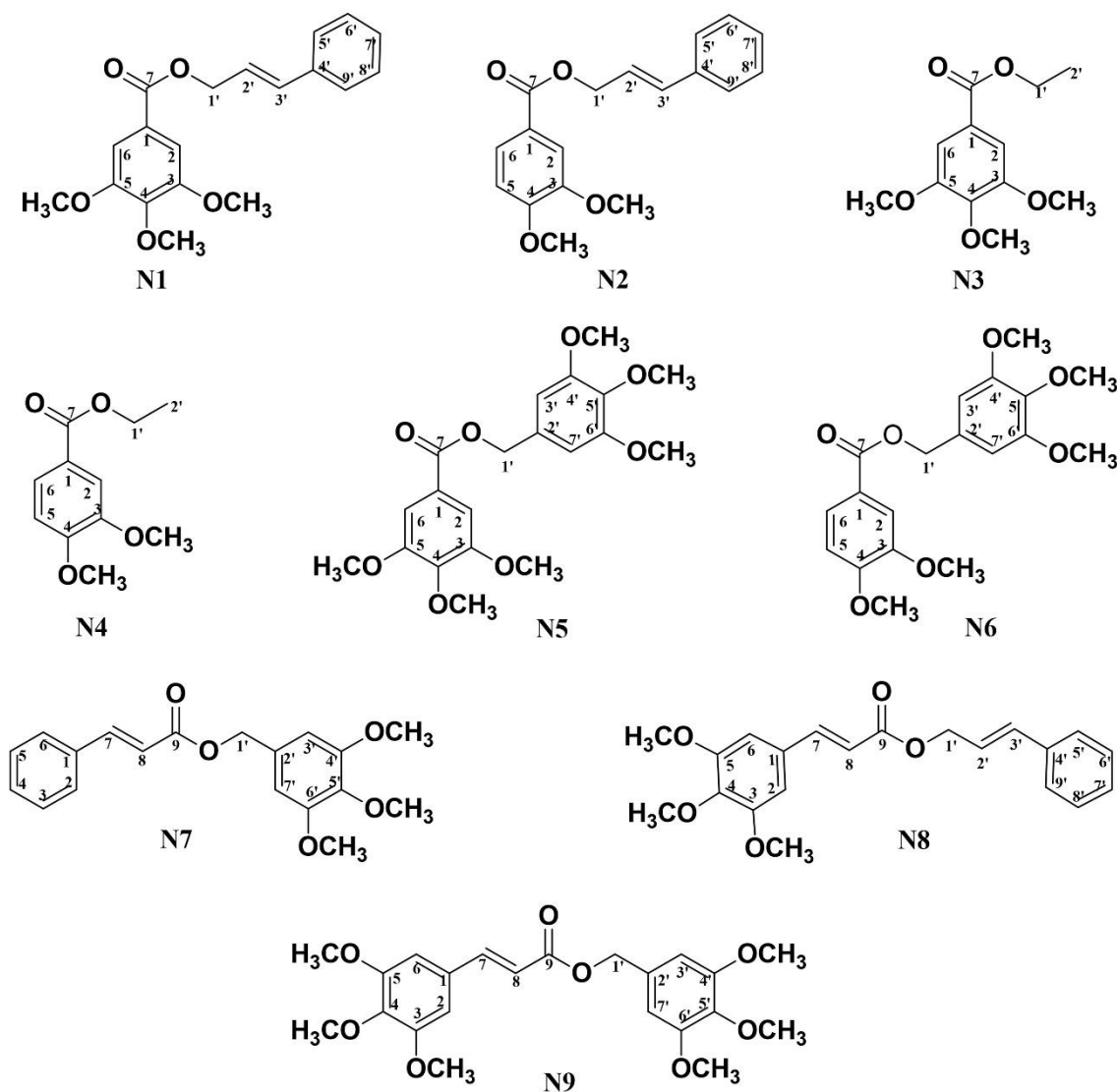


Figura 2.4. Análogos de galato de arilo sintetizados en base a los resultados del modelo QSAR (ec 1).

Posteriormente, las moléculas propuestas fueron diseñadas y optimizadas con Spartan'18, para finalmente predecir su efecto citotóxico utilizando nuestro modelo QSAR. Las IC_{50pred} de los compuestos diseñados se presentan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Valores de los descriptores moleculares y de las actividades citotóxicas predichas de los derivados N1-N9.

Mol	ΔSv	ΔnAT	$\Delta nR06$	$\Delta J3D$	$\Delta ADDD$	$\Delta SPAN$	$\Delta HOMA$	nArCOOR	$\Delta O-057$	$\Delta TE2$	$\Delta MLOGP$	$\Delta MLOGP2$	$IC_{50PredHeLa}$
N1	16.19	26	1	0.614	16.873	1.325	-0.012	1	-4	2.728	2.955	9.162	6.41
N2	14.08	22	1	0.332	14.409	1.433	0.026	1	-4	0.77	3.242	10.984	5.93
N3	7.99	15	0	0.993	11.69	1.206	-0.126	1	-4	2.153	1.526	2.553	12.89
N4	5.88	11	0	0.711	8.217	0.913	0.041	1	-4	0.277	1.765	3.373	12.23
N5	19.92	34	1	1.009	22.111	1.501	0.075	1	-4	6.809	0.98	1.104	10.19
N6	17.81	30	1	0.855	19.224	0.991	0.128	1	-4	5.135	1.501	2.473	12.13
N7	16.19	26	1	-0.338	24.087	4.483	0.071	0	-4	3.355	2.687	7.611	25.61
N8	18.78	30	1	0.636	19.797	1.889	-0.055	0	-4	4.114	3.062	9.82	19.31
N9	22.52	38	1	1.076	24.479	1.666	0.014	0	-4	8.352	1.344	2.004	28.99

En la tabla anterior podemos observar que las IC_{50Pred} para los compuestos diseñados se encuentran en un rango de 5.93 a 28.99 μM , siendo los compuestos **N1** y **N2** los más activos en la línea celular HeLa, de acuerdo con la predicción de nuestro modelo QSAR. Sin embargo, se procedió a la síntesis de este conjunto de nueve moléculas para realizar una comparación de las actividades predichas y experimentales.

2.3 CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo QSAR con una capacidad predictiva adecuada ($Q^2 = 0.69$ y $Q_{ext}^2 = 0.62$), mediante un conjunto final de 134 moléculas analizadas, las cuales en sus estructuras presentaban anillos aromáticos de ácidos gálico, ácido

cinámico, curcumina, podofilotoxina y chalconas, destacando los anillos trimetoxilados

El modelo QSAR generado está conformado de 14 variables, pertenecientes a seis familias de descriptores, que mostraron la importancia de la forma, el tamaño, la hidrofobicidad y la presencia de grupos funcionales específicos en la plantilla fenólica. Se observó que pequeños cambios en las moléculas, reflejan cambios significativos en su IC_{50} predicha para la línea celular HeLa (cáncer cervicouterino). Por lo tanto, se determinó que, para mejorar la actividad biológica de las nuevas moléculas, es necesaria la presencia de ésteres aromáticos ($nArCOOR$), anillos de 6 miembros ($nR06$), y un aumento del número de átomos (nAT) y de la lipofilia ($MLOGP$). Además, de que las moléculas deben de ser plegadas ($ADDD$) y restringidas conformacionalmente ($SPAN$); así como también es altamente recomendable evitar la presencia de ácidos carboxílicos ($nRCOOH$) grupos OH ($O - 057$) e iminas aromáticas ($nArC = N$).

Finalmente, con ayuda del QSAR, se propuso una estrategia para el diseño de moléculas, que mejoran su actividad citotóxica en la línea celular HeLa. Esto nos llevó al diseño y la predicción de la IC_{50} de nueve nuevos derivados del ácido gálico (**N1-N9**).

2.4 REFERENCIAS

1. Czyżewska U, Siemionow K, Zareba I, Milyk W. Proapoptotic activity of propolis and their components on human tongue squamous cell carcinoma cell line (CAL-27). *PLoS One*. 2016 Jun 1;11(6).
2. Duan YT, Man RJ, Tang DJ, Yao YF, Tao XX, Yu C, et al. Design, Synthesis and Antitumor Activity of Novel link-bridge and B-Ring Modified Combretastatin A-4 (CA-4) Analogues as Potent Antitubulin Agents. *Sci Rep*. 2016 May 3;6.
3. Esposito T, Sansone F, Franceschelli S, Del Gaudio P, Picerno P, Aquino RP, et al. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells extract: Phenolic composition, antioxidant effect and cytotoxic activity on human cancer cell lines. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 13;18(2).
4. Ethiraj KR, Aranjani JM, Khan FRN. Synthesis of methoxy-substituted chalcones and in vitro evaluation of their anticancer potential. *Chem Biol Drug Des*. 2013 Dec;82(6):732–42.
5. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girão Da Cruz MT, Cordeiro MNDS, Milhazes N, et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties - A structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic Med Chem*. 2004 Jul 1;12(13):3581–9.
6. Ivković BM, Nikolic K, Ilić BB, Žižak ŽS, Novaković RB, Čudina OA, et al. Phenylpropiofenone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activity relationship study. *Eur J Med Chem*. 2013;63:239–55.
7. Kolundžija B, Marković V, Stanojković T, Joksović L, Matić I, Todorović N, et al. Novel anthraquinone based chalcone analogues containing an imine fragment: Synthesis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2014 Jan 1;24(1):65–71.
8. Konieczny MT, Bułakowska A, Polak J, Pirska D, Konieczny W, Gryń P, et al. Structural factors affecting cytotoxic activity of (E)-1-(Benzo[d][1,3]oxathiol-6-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one derivatives. *Chem Biol Drug Des*. 2014;84(1):86–91.
9. Li PH, Jiang H, Zhang WJ, Li YL, Zhao MC, Zhou W, et al. Synthesis of carbazole derivatives containing chalcone analogs as non-intercalative topoisomerase II catalytic inhibitors and apoptosis inducers. *Eur J Med Chem*. 2018 Feb 10;145:498–510.
10. Maioral MF, Bodack C do N, Stefanos NM, Bigolin Á, Mascarello A, Chiaradia-Delatorre LD, et al. Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. *Biochimie*. 2017 Sep 1;140:48–57.
11. Preti D, Romagnoli R, Rondanin R, Cacciari B, Hamel E, Balzarini J, et al. Design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and apoptosis-inducing studies of 1-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-3-(2'-alkoxycarbonylindolyl)-2-propen-1-one derivatives obtained by a molecular hybridisation approach. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2018 Jan 1;33(1):1225–38.
12. Shankaraiah N, Siraj KP, Nekkanti S, Srinivasulu V, Sharma P, Senwar KR, et al. DNA-binding affinity and anticancer activity of β -carboline-chalcone conjugates as potential DNA intercalators: Molecular modelling and synthesis. *Bioorg Chem*. 2015;59:130–9.
13. Zhang J, Zhu W fang, Xu J, Kitdamrongtham W, Manosroi A, Manosroi J, et al. Potential cancer chemopreventive and anticancer constituents from the fruits of *Ficus hispida* L.f. (Moraceae). *J Ethnopharmacol*. 2018 Mar 25;214:37–46.
14. Arroyo J, Herrera Calderón O, Chávez Asmat R, Ventura E, Buendía J, Pacheco J, et al. Efecto antitumoral in vitro del aceite esencial de *Piper aduncum* L. (matico) y su toxicidad oral en ratones. *An la Fac Med*. 2014;75(1):13.
15. Dahlawi H, Jordan-Mahy N, Clench MR, Le Maitre CL. Bioactive actions of pomegranate fruit extracts on leukemia cell lines in vitro hold promise for new therapeutic agents for leukemia. *Nutr Cancer*. 2012;64(1):100–10.
16. Wavefunction I. SPARTA'18. Irvine; 2019.
17. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model*. 2007 Dec;13(12):1173–213.
18. Talete S. DRAGON for Windows (software for molecular descriptor calculations). Milano; 2006.
19. Ma B, Chen H, Xu M, Hayat T, He Y, Xu J. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) models for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation in rhizosphere based on molecular structure and effect size. *Environ Pollut*. 2010 Aug;158(8):2773–7.
20. McElroy NR, Jurs PC. Prediction of Aqueous Solubility of Heteroatom-Containing Organic Compounds from Molecular Structure. *J Chem Inf Comput Sci*. 2001;41(3–6):1237–47.
21. Todeschini R, Ballabio D, Consonni V, Mauri A, Pavan M. MobyDigs-Version 1.0. 2004.

22. Santiago ángel, Razo-Hernández RS, Pastor N. Revealing the Structural Contributions to Thermal Adaptation of the TATA-Box Binding Protein: Molecular Dynamics and QSPR Analyses. *J Chem Inf Model*. 2020;60(2):866–79.
23. Cruciani G, Baroni M, Clementi S, Costantino G, Riganelli D, Skagerberg B. Predictive ability of regression models. Part I: Standard deviation of prediction errors (SDEP). *J Chemom*. 1992;6(6):335–46.
24. Toropov AA, Toropova AP. QSAR as a random event: criteria of predictive potential for a chance model. *Struct Chem*. 2019;30(5):1677–83.
25. Todeschini R, Consonni V. R-Z. In: *Handbook of Molecular Descriptor*. first. New York: Wiley-VCH; 2000. p. 366–510.
26. Todeschini R, Consonni V. A-D. In: *Handbook of Molecular Descriptor*. first. New York: Wiley-VCH; 2000. p. 1–123.
27. Todeschini R, Consonni V. E-H. In: *Handbook of Molecular Descriptor*. first. New York: Wiley-VCH; 2000. p. 124–226.
28. Randić M, Kleiner AF, DeAlba LM. Distance/Distance Matrixes. *J Chem Inf Comput Sci*. 1994;34(2):277–86.
29. Randić M, Krilov G. On a Characterization of the Folding of Proteins. *Int J Quantum Chem*. 1999;75:1017–26.
30. Balaban AT. Highly discriminating distance-based topological index. *Chem Phys Lett*. 1982;89(5):399–404.
31. McFarland JW. On the parabolic relationship between drug potency and hydrophobicity. *J Med Chem*. 1970;13(6):1192–6.
32. Purcell WP, Bass GE, Calyton JM. Linear Free Energy-Related Model: Theory and Description in STRATEGY OF DRUG DESIGN A MOLECULAR GUIDE TO BIOLOGICAL ACTIVITY. In: *STRATEGY OF DRUG DESIGN A MOLECULAR GUIDE TO BIOLOGICAL ACTIVITY*. First. New York: John Wiley & Sons; 1973. p. 21–38.

2.5 ANEXOS

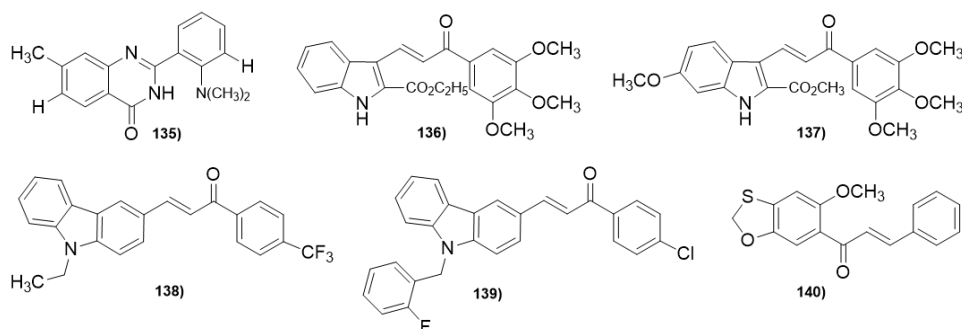


Figura 2.1S Conjunto de moléculas excluidas de la generación del modelo QSAR.

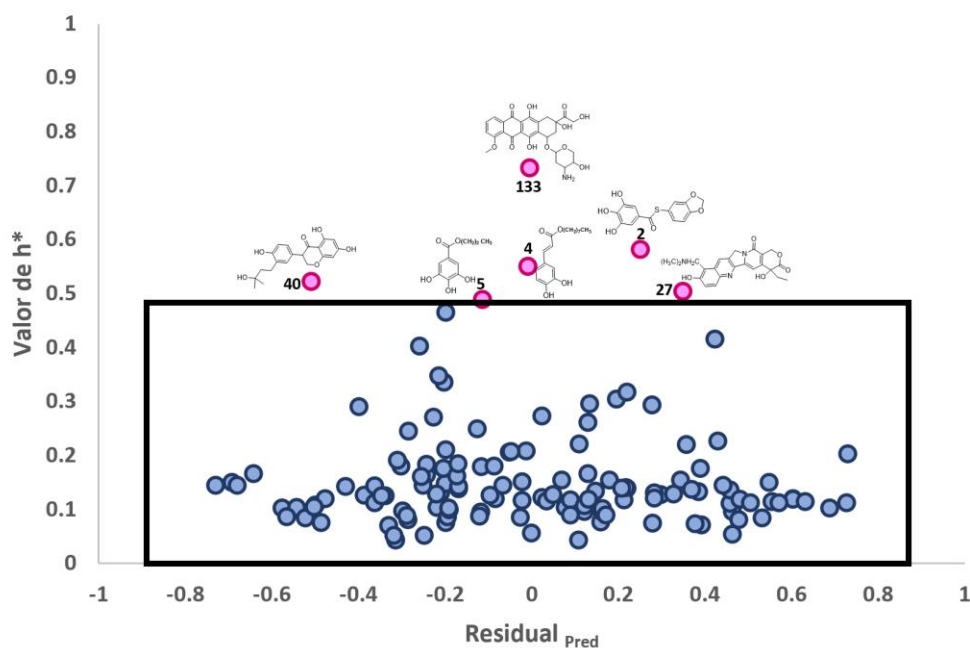


Figura 2.2S Dominio de aplicabilidad del modelo QSAR (Ec. 1). Gráfico de Williams del residuo de predicción frente a los valores de apalancamiento de los compuestos aromáticos con actividad citotóxica. La línea horizontal muestra el apalancamiento de advertencia ($h^*=3h=0,484$), las dos líneas verticales indican los límites dentro de los cuales deben estar todos los residuos ($3SDEC= 0,877$). Los compuestos 2, 4, 5, 27, 40 y 133 que se encuentran fuera del recuadro negro se identifican como valores atípicos.

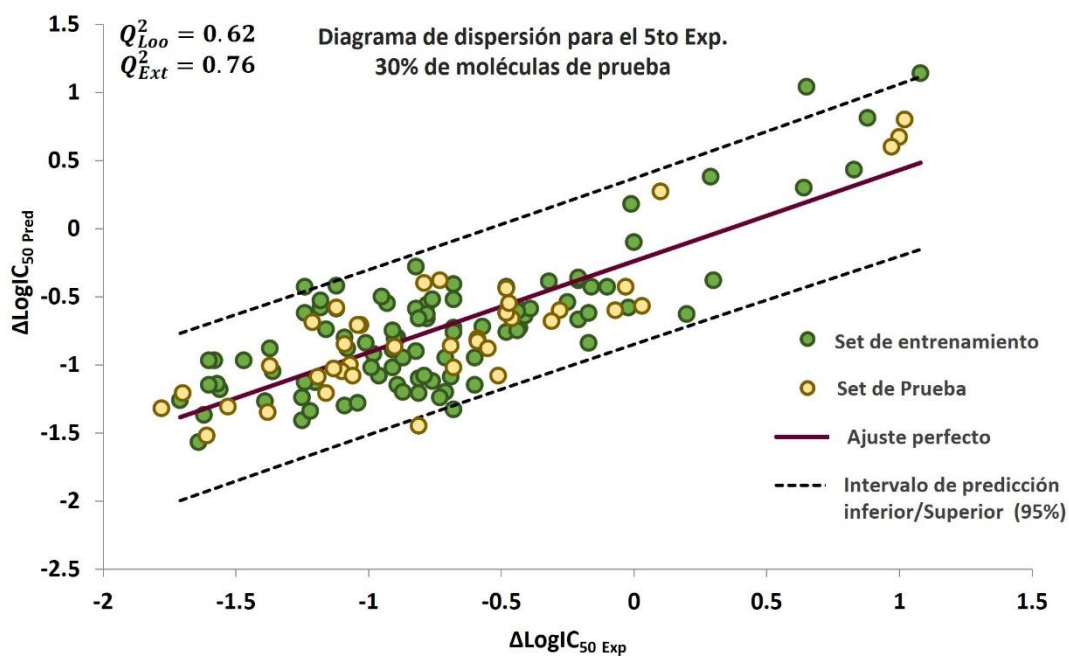


Figure 2.3S. 5to experimento de la actividad predictiva del modelo QSAR.

Tabla 2.1S. Descriptores moleculares usados durante la construcción del modelo QSAR.

Molécula	Log IC ₅₀	Sv	nAT	nR06	J3D	ADDD	SPAN	HOMA	nRCOOH	nArCOOR	nArC=N	O-057	TE2	MLOGP	MLOGP2
1	2.06	18.23	30	1	3.106	28.78	7	0.454	0	0	0	2	9.353	1.765	3.116
2	1.96	26.22	45	1	4.977	35.267	5.63	0.463	0	0	0	2	12.72	3.961	15.691
3	1.08	16.15	27	1	3.193	25.896	5.614	0.544	0	1	0	3	9.469	1.027	1.054
4	1.85	24.13	42	1	4.923	33.964	5.116	0.545	0	1	0	3	12.813	3.303	10.909
5	0.90	20.57	31	2	1.725	31.478	6.811	0.674	0	1	0	3	10.364	0.369	0.136
6	1.65	21.15	31	2	2.131	27.981	5.126	0.661	0	0	0	3	9.013	0.317	0.1
7	0.96	30.11	47	3	2.311	44.302	7.492	0.383	0	0	0	0	10.585	3.477	12.088
8	1.58	25.92	40	2	2.274	39.946	7.538	0.472	0	0	0	0	10.771	3.2	10.237
9	1.10	25.92	40	2	2.085	40.54	9.564	0.478	0	0	0	0	10.837	3.2	10.237
10	1.04	30.13	48	2	2.399	47.997	9.226	0.429	0	0	0	0	10.796	2.591	6.711
11	1.18	30.13	48	2	2.501	46.68	7.899	0.437	0	0	0	0	12.237	2.591	6.711
12	1.08	23.1	32	2	2.019	33.27	7.97	0.463	0	0	0	0	6.32	4.916	24.168
13	1.04	32.76	53	2	2.767	50.118	9.009	0.483	0	0	0	1	21.599	1.278	1.634
14	1.05	30.11	47	3	2.035	46.264	9.547	0.384	0	0	0	0	10.821	3.477	12.088
15	1.08	29.54	46	2	2.126	43.654	7.593	0.31	0	0	0	2	11.301	2.199	4.833
16	1.18	34.33	55	3	2.387	51.721	8.197	0.346	0	0	0	0	11.474	2.843	8.084
17	1.15	34.33	55	3	2.364	51.983	8.878	0.362	0	0	0	0	12.904	2.843	8.084
18	1.04	27.29	39	3	2.045	39.102	7.585	0.38	0	0	0	0	6.497	5.193	26.971
19	0.79	27.29	39	3	2.04	39.179	8.046	0.374	0	0	0	0	7.038	5.193	26.971
20	0.95	28.06	39	3	2.036	39.297	8.195	0.373	0	0	0	0	6.988	5.408	29.249
21	0.66	22.93	34	3	1.969	33.845	7.041	0.643	0	0	0	0	11.525	3.603	12.981
22	0.39	24.68	38	3	2.171	36.701	6.559	0.615	0	0	0	0	12.757	3.483	12.134
23	1.15	30.47	49	3	2.331	45.914	7.432	0.577	0	0	0	0	15.862	3.661	13.404
24	1.05	22.93	34	3	1.981	33.94	6.887	0.659	0	0	0	0	13.086	3.603	12.981
25	0.95	20.6	30	3	1.827	31.03	6.061	0.656	0	0	0	0	11.025	3.924	15.399
26	1.26	24.68	38	3	2.19	36.747	6.18	0.627	0	0	0	0	14.342	3.483	12.134
27	0.88	45.22	74	5	1.686	68.889	9.349	0.853	0	0	0	1	21.084	0.133	0.018
28	0.15	22.59	35	3	2.136	34.784	6.002	0.381	0	0	0	0	10.64	1.875	3.514
29	2.69	12.41	19	1	2.744	18.995	4.775	0.49	1	0	0	1	5.042	1.997	3.987
30	2.86	12.93	20	1	2.776	19.991	5.079	0.52	1	0	0	2	7.474	1.429	2.042
31	2.74	13.44	21	1	2.844	20.969	4.874	0.467	1	0	0	3	7.526	0.889	0.791
32	2.83	25.99	43	2	2.96	39.382	7.358	0.498	1	0	0	3	16.239	-0.663	0.439
33	2.50	14.61	24	1	3.354	22.563	4.496	0.933	0	0	0	1	6.221	2.11	4.453
34	2.51	15.04	24	1	3.078	23.277	4.795	0.494	1	0	0	2	7.478	1.193	1.422
35	2.88	16.63	27	1	3.256	25.805	5.505	0.476	1	0	0	1	7.532	1.484	2.202
36	2.94	18.74	31	1	3.547	29.401	5.575	0.533	1	0	0	1	10.136	1.245	1.551
37	1.86	11.35	18	1	2.823	18.069	4.238	0.573	0	0	0	4	7.557	0.073	0.005
38	2.15	28.65	47	2	2.504	43.459	6.231	0.921	0	0	0	2	12.492	1.209	1.462
39	2.16	29.05	46	2	2.417	43.701	7.839	0.61	0	0	0	1	10.996	1.279	1.636

Capítulo II

40	1.17	29.05	46	3	2.381	42.589	7.351	0.488	0	0	0	3	21.194	2.182	4.762
41	0.93	30.02	47	2	2.03	46.274	8.48	0.499	0	0	0	0	11.222	2.591	6.711
42	1.38	31.62	50	2	2.1	48.769	8.299	0.491	0	0	0	0	12.262	2.809	7.892
43	1.76	33.21	53	2	2.198	50.688	8.176	0.489	0	0	0	0	12.791	3.024	9.145
44	0.77	40.41	63	3	2.333	52.508	7.813	0.581	0	0	0	0	14.068	4.025	16.197
45	1.38	28.42	45	2	2.553	39.106	6.182	0.713	0	0	0	0	13.766	1.85	3.421
46	1.53	30.01	48	2	2.637	41.323	6.295	0.713	0	0	0	0	14.7	2.077	4.315
47	1.83	31.61	51	2	2.709	43.463	6.777	0.716	0	0	0	0	15.226	2.3	5.291
48	0.68	38.81	61	3	2.432	49.848	7.228	0.781	0	0	0	0	16.317	3.336	11.13
49	1.43	30.41	48	2	2.422	41.688	7.322	0.634	0	0	0	0	12.775	2.054	4.221
50	1.55	32.01	51	2	2.511	43.762	7.477	0.636	0	0	0	0	13.768	2.277	5.187
51	1.89	33.6	54	2	2.636	45.299	6.978	0.631	0	0	0	0	14.441	2.496	6.231
52	0.76	40.8	64	3	2.308	52.34	8.722	0.714	0	0	0	0	15.444	3.516	12.363
53	0.30	37.18	57	4	1.501	55.759	9.518	0.533	0	0	0	0	13.601	3.562	12.686
54	1.84	30.59	44	3	1.692	44.288	7.863	0.531	0	0	0	0	9.334	4.984	24.841
55	1.61	30.59	44	3	1.691	44.274	7.724	0.524	0	0	0	0	9.712	4.984	24.841
56	1.40	30	44	3	1.695	44.16	7.81	0.53	0	0	0	0	10.445	4.879	23.805
57	0.97	34.11	52	3	1.758	50.375	8.744	0.525	0	0	0	0	11.942	3.816	14.563
58	0.83	33.08	50	3	1.747	49.258	8.704	0.528	0	0	0	0	12.944	4.924	24.243
59	1.38	31.59	47	3	1.687	47.009	8.597	0.535	0	0	0	0	13.285	5.088	25.891
60	1.38	36.3	51	4	1.538	50.751	9.47	0.614	0	0	0	0	10.124	6.146	37.769
61	0.91	37.78	54	4	1.608	52.396	8.926	0.612	0	0	0	0	11.722	5.974	35.685
62	1.79	36.18	51	4	1.56	50.278	8.938	0.617	0	0	0	0	9.685	5.781	33.419
63	1.18	36.3	51	4	1.545	50.576	9.022	0.613	0	0	0	0	9.943	6.146	37.769
64	1.41	36.41	51	4	1.545	50.63	9.304	0.61	0	0	0	0	11.013	6.51	42.376
65	1.45	36.3	51	4	1.559	50.338	9.201	0.614	0	0	0	0	10.83	6.146	37.769
66	1.47	36.89	51	4	1.557	50.438	9.535	0.612	0	0	0	0	9.649	6.242	38.959
67	0.74	37.6	53	4	1.588	51.738	9.42	0.61	0	0	0	0	12.175	5.716	32.669
68	1.42	45.94	71	4	1.779	66.526	9.385	0.495	0	0	0	0	18.16	1.046	1.094
69	1.69	41.03	61	4	1.715	58.26	8.783	0.503	0	0	0	0	15.752	2.573	6.622
70	0.99	40.6	61	4	1.716	58.173	9.198	0.513	0	0	0	0	17.512	1.963	3.852
71	1.29	40.12	60	4	1.716	57.279	8.558	0.515	0	0	0	1	16.768	1.963	3.852
72	1.27	33.5	47	4	1.505	47.527	8.319	0.542	0	0	0	0	10.862	4.695	22.047
73	0.85	34.81	49	4	1.5	49.399	8.877	0.534	0	0	0	0	11.423	4.326	18.712
74	1.07	34.39	49	4	1.502	49.286	9.179	0.544	0	0	0	0	13.156	3.787	14.344
75	0.87	43.83	67	4	1.787	61.75	9.503	0.496	0	0	0	0	15.875	1.597	2.551
76	0.28	38.49	57	4	1.621	55.392	9.45	0.521	0	0	0	0	15.338	2.526	6.382
77	0.76	36.92	53	4	1.568	52.283	8.875	0.513	0	0	0	0	12.538	3.766	14.185
78	0.50	36.5	53	4	1.571	52.124	9.38	0.525	0	0	0	0	14.307	3.199	10.236
79	0.62	39.51	56	5	1.889	46.401	6.752	0.273	0	0	1	0	11.697	4.855	23.572
80	0.74	39.51	56	5	1.899	46.228	6.882	0.269	0	0	1	0	13.127	4.855	23.572

Capítulo II

81	1.05	39.51	56	5	1.685	48.861	8.535	0.274	0	0	1	0	12.043	4.855	23.572
82	0.68	38.02	53	5	1.69	46.472	8.083	0.276	0	0	1	0	10.02	4.76	22.661
83	1.06	38.02	53	5	1.777	45.422	6.735	0.285	0	0	1	0	11.68	4.76	22.661
84	1.65	38.02	53	5	1.682	46.613	8.167	0.275	0	0	1	0	10.523	4.76	22.661
85	1.13	38.61	53	5	1.806	45.137	7.005	0.278	0	0	1	0	10.986	4.855	23.572
86	1.65	38.61	53	5	1.811	45.062	6.817	0.276	0	0	1	0	10.196	4.855	23.572
87	1.69	39.33	55	5	1.77	47.054	7.662	0.27	0	0	1	0	12.056	4.444	19.75
88	1.10	39.33	55	5	1.84	46.158	7.165	0.273	0	0	1	0	13.305	4.444	19.75
89	1.38	38.42	54	5	1.823	45.579	7.249	0.27	0	0	1	1	11.478	3.877	15.033
90	1.42	39.84	56	5	1.883	46.483	7.459	0.267	0	0	1	0	11.381	5.136	26.378
91	1.27	44.62	63	5	1.587	53.09	9.21	0.195	0	0	1	0	12.888	4.283	18.342
92	1.70	45.19	63	5	1.86	49.004	6.743	0.301	0	0	1	0	12.542	5.07	25.71
93	1.13	46.9	69	6	1.823	54.607	7.546	0.278	0	0	1	0	13.626	5.38	28.941
94	0.96	46.7	66	6	1.833	51.362	7.32	0.371	0	0	1	0	13.193	5.754	33.114
95	1.18	21.54	32	2	2.355	31.685	6.671	0.412	0	0	0	1	9.224	4.539	20.607
96	0.65	21.21	32	2	2.355	31.52	6.269	0.458	0	0	0	1	9.723	3.909	15.278
97	0.82	19.72	29	2	2.192	29.101	6.246	0.507	0	0	0	1	8.327	4.053	16.426
98	0.62	20.31	29	2	2.184	29.233	6.31	0.455	0	0	0	1	7.544	4.177	17.445
99	0.95	19.72	29	2	2.186	29.138	6.164	0.458	0	0	0	1	8.26	4.053	16.426
100	0.70	21.21	32	2	2.224	32.031	6.989	0.511	0	0	0	1	9.968	3.909	15.278
101	0.77	27.92	42	3	2.172	38.706	7.355	0.45	0	0	0	0	9.094	3.844	14.777
102	0.70	30.03	46	3	2.26	41.891	7.503	0.449	0	0	0	0	10.35	3.523	12.412
103	0.29	30.03	46	3	2.016	44.646	8.345	0.434	0	0	0	0	10.917	3.523	12.412
104	0.99	27.92	42	3	1.944	41.098	8.051	0.479	0	0	0	0	11.221	3.844	14.777
105	0.82	27.92	42	3	1.947	41.174	8.127	0.429	0	0	0	0	11.671	3.844	14.777
106	0.66	30.03	46	3	2.116	44.01	8.112	0.491	0	0	0	0	13.636	3.523	12.412
107	0.49	23.81	35	2	1.995	33.662	7.296	0.452	0	0	0	0	7.554	2.949	8.698
108	0.16	25.92	39	2	2.002	37.053	8.549	0.46	0	0	0	0	9.727	2.379	5.659
109	0.26	26.43	40	2	2.016	38.075	8.389	0.437	0	0	0	1	10.018	1.591	2.532
110	0.62	26.03	39	2	1.996	37.189	8.343	0.441	0	0	0	0	8.818	2.496	6.229
111	0.78	30.14	47	2	2.306	43.071	8.202	0.466	0	0	0	0	15.278	1.279	1.636
112	0.73	28.03	43	2	2.178	39.684	8.356	0.431	0	0	0	1	11.406	1.824	3.326
113	1.26	27.63	42	2	2.154	38.854	8.3	0.436	0	0	0	0	10.194	2.726	7.429
114	1.17	31.73	50	2	2.387	44.897	7.873	0.423	0	0	0	0	13.454	1.502	2.257
115	0.95	27	41	2	2.338	37.084	7.131	0.451	0	0	0	0	11.482	3.419	11.69
116	1.05	29.11	45	2	2.337	40.328	8.56	0.461	0	0	0	0	13.71	2.839	8.059
117	1.35	29.22	45	2	2.328	40.486	8.352	0.448	0	0	0	0	12.761	2.951	8.707
118	1.31	27	41	2	2.292	37.231	7.156	0.456	0	0	0	0	9.381	3.419	11.69
119	0.47	25.45	39	2	2.007	36.891	8.081	0.412	0	0	0	0	9.992	2.114	4.469
120	0.49	29.56	47	2	2.14	44.471	8.127	0.407	0	0	0	0	13.751	0.926	0.858
121	0.48	32.04	50	2	2.698	41.661	6.383	0.36	0	1	0	0	12.816	2.016	4.065

Capítulo II

122	0.24	34.15	54	2	2.951	43.032	6.465	0.377	0	1	0	0	15.469	1.483	2.199
123	0.25	35.75	57	2	2.957	45.673	7.259	0.367	0	1	0	0	16.859	1.694	2.869
124	0.33	35.75	57	2	3.021	45.519	6.504	0.374	0	1	0	0	15.28	1.694	2.869
125	0.26	35.24	56	2	3.055	44.74	6.205	0.385	0	1	0	0	14.96	2.442	5.964
126	1.18	35.75	57	2	3.075	45.557	6.368	0.398	0	1	0	0	16.651	1.694	2.869
127	0.08	37.35	60	2	3.215	47.441	6.82	0.373	0	1	0	0	17.763	1.902	3.616
128	0.61	38.95	63	2	3.262	49.678	7.324	0.368	0	1	0	0	18.615	2.106	4.435
129	0.80	37.35	60	2	3.262	47.315	5.822	0.367	0	1	0	0	16.175	1.902	3.616
130	0.64	42.95	67	3	2.754	52.929	6.649	0.486	0	1	0	0	17.534	2.68	7.182
131	0.61	44.54	70	3	2.827	55.178	6.65	0.483	0	1	0	0	17.493	2.87	8.238
132	0.74	26.54	43	2	3.041	37.309	6.469	0.631	0	0	0	1	11.47	2.061	4.247
133	0.22	41.99	68	5	2.228	60.932	7.77	0.312	0	0	0	2	25.8	-0.816	0.666
134	1.18	18.49	28	2	1.892	28.655	6.01	0.724	0	0	0	0	9.206	1.29	1.665
135*	1.64	22.42	33	3	1.956	33.307	6.711	0.612	0	0	0	0	9.763	4.411	19.454
136*	0.32	30.59	44	3	1.69	44.333	8.097	0.534	0	0	0	0	9.91	4.984	24.841
137*	0.38	31.82	47	3	1.683	47.157	8.806	0.526	0	0	0	0	10.428	5.294	28.03
138*	1.67	27.92	42	3	2.069	40.427	7.182	0.431	0	0	0	0	8.976	3.844	14.777
139*	0.28	37.91	53	5	1.685	46.518	8.356	0.27	0	0	1	0	10.433	4.665	21.761
140*	0.27	34.93	56	2	2.676	48.493	8.262	0.484	0	0	0	0	17.892	1.936	3.747

*Moléculas excluidas del modelo QSAR

Tabla 2.2S. Δ valores de los descriptores moleculares del modelo QSAR

Molécula	LogIC ₅₀	ΔSv	ΔnAT	ΔnR06	ΔJ3D	ΔAADD	ΔSPAN	ΔHOMA	nRCOOH	nArCOOR	nArC=N	ΔO-057	ΔTE2	ΔMLOGP	ΔMLOGP2
1	2.06	6.88	12	0	0.283	10.711	2.762	-0.119	0	0	0	-2	1.796	1.692	3.111
2	1.96	14.87	27	0	2.154	17.198	1.392	-0.11	0	0	0	-2	5.163	3.888	15.686
3	1.08	4.8	9	0	0.37	7.827	1.376	-0.029	0	1	0	-1	1.912	0.954	1.049
4	1.85	12.78	24	0	2.1	15.895	0.878	-0.028	0	1	0	-1	5.256	3.23	10.904
5	0.90	9.22	13	1	-1.098	13.409	2.573	0.101	0	1	0	-1	2.807	0.296	0.131
6	1.65	9.8	13	1	-0.692	9.912	0.888	0.088	0	0	0	-1	1.456	0.244	0.095
7	0.96	18.76	29	2	-0.512	26.233	3.254	-0.19	0	0	0	-4	3.028	3.404	12.083
8	1.58	14.57	22	1	-0.549	21.877	3.3	-0.101	0	0	0	-4	3.214	3.127	10.232
9	1.10	14.57	22	1	-0.738	22.471	5.326	-0.095	0	0	0	-4	3.28	3.127	10.232
10	1.04	18.78	30	1	-0.424	29.928	4.988	-0.144	0	0	0	-4	3.239	2.518	6.706
11	1.18	18.78	30	1	-0.322	28.611	3.661	-0.136	0	0	0	-4	4.68	2.518	6.706
12	1.08	11.75	14	1	-0.804	15.201	3.732	-0.11	0	0	0	-4	-1.237	4.843	24.163
13	1.04	21.41	35	1	-0.056	32.049	4.771	-0.09	0	0	0	-3	14.042	1.205	1.629
14	1.05	18.76	29	2	-0.788	28.195	5.309	-0.189	0	0	0	-4	3.264	3.404	12.083
15	1.08	18.19	28	1	-0.697	25.585	3.355	-0.263	0	0	0	-2	3.744	2.126	4.828
16	1.18	22.98	37	2	-0.436	33.652	3.959	-0.227	0	0	0	-4	3.917	2.77	8.079
17	1.15	22.98	37	2	-0.459	33.914	4.64	-0.211	0	0	0	-4	5.347	2.77	8.079
18	1.04	15.94	21	2	-0.778	21.033	3.347	-0.193	0	0	0	-4	-1.06	5.12	26.966
19	0.79	15.94	21	2	-0.783	21.11	3.808	-0.199	0	0	0	-4	-0.519	5.12	26.966
20	0.95	16.71	21	2	-0.787	21.228	3.957	-0.2	0	0	0	-4	-0.569	5.335	29.244
21	0.66	11.58	16	2	-0.854	15.776	2.803	0.07	0	0	0	-4	3.968	3.53	12.976
22	0.39	13.33	20	2	-0.652	18.632	2.321	0.042	0	0	0	-4	5.2	3.41	12.129
23	1.15	19.12	31	2	-0.492	27.845	3.194	0.004	0	0	0	-4	8.305	3.588	13.399
24	1.05	11.58	16	2	-0.842	15.871	2.649	0.086	0	0	0	-4	5.529	3.53	12.976
25	0.95	9.25	12	2	-0.996	12.961	1.823	0.083	0	0	0	-4	3.468	3.851	15.394
26	1.26	13.33	20	2	-0.633	18.678	1.942	0.054	0	0	0	-4	6.785	3.41	12.129
27	0.88	33.87	56	4	-1.137	50.82	5.111	0.28	0	0	0	-3	13.527	0.06	0.013
28	0.15	11.24	17	2	-0.687	16.715	1.764	-0.192	0	0	0	-4	3.083	1.802	3.509
29	2.69	1.06	1	0	-0.079	0.926	0.537	-0.083	1	0	0	-3	-2.515	1.924	3.982
30	2.86	1.58	2	0	-0.047	1.922	0.841	-0.053	1	0	0	-2	-0.083	1.356	2.037
31	2.74	2.09	3	0	0.021	2.9	0.636	-0.106	1	0	0	-1	-0.031	0.816	0.786
32	2.83	14.64	25	1	0.137	21.313	3.12	-0.075	1	0	0	-1	8.682	-0.736	0.434
33	2.50	3.26	6	0	0.531	4.494	0.258	0.36	0	0	0	-3	-1.336	2.037	4.448
34	2.51	3.69	6	0	0.255	5.208	0.557	-0.079	1	0	0	-2	-0.079	1.12	1.417
35	2.88	5.28	9	0	0.433	7.736	1.267	-0.097	1	0	0	-3	-0.025	1.411	2.197
36	2.94	7.39	13	0	0.724	11.332	1.337	-0.04	1	0	0	-3	2.579	1.172	1.546
37	1.86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	2.15	17.3	29	1	-0.319	25.39	1.993	0.348	0	0	0	-2	4.935	1.136	1.457
39	2.16	17.7	28	1	-0.406	25.632	3.601	0.037	0	0	0	-3	3.439	1.206	1.631

40	1.17	17.7	28	2	-0.442	24.52	3.113	-0.085	0	0	0	-1	13.637	2.109	4.757
41	0.93	18.67	29	1	-0.793	28.205	4.242	-0.074	0	0	0	-4	3.665	2.518	6.706
42	1.38	20.27	32	1	-0.723	30.7	4.061	-0.082	0	0	0	-4	4.705	2.736	7.887
43	1.76	21.86	35	1	-0.625	32.619	3.938	-0.084	0	0	0	-4	5.234	2.951	9.14
44	0.77	29.06	45	2	-0.49	34.439	3.575	0.008	0	0	0	-4	6.511	3.952	16.192
45	1.38	17.07	27	1	-0.27	21.037	1.944	0.14	0	0	0	-4	6.209	1.777	3.416
46	1.53	18.66	30	1	-0.186	23.254	2.057	0.14	0	0	0	-4	7.143	2.004	4.31
47	1.83	20.26	33	1	-0.114	25.394	2.539	0.143	0	0	0	-4	7.669	2.227	5.286
48	0.68	27.46	43	2	-0.391	31.779	2.99	0.208	0	0	0	-4	8.76	3.263	11.125
49	1.43	19.06	30	1	-0.401	23.619	3.084	0.061	0	0	0	-4	5.218	1.981	4.216
50	1.55	20.66	33	1	-0.312	25.693	3.239	0.063	0	0	0	-4	6.211	2.204	5.182
51	1.89	22.25	36	1	-0.187	27.23	2.74	0.058	0	0	0	-4	6.884	2.423	6.226
52	0.76	29.45	46	2	-0.515	34.271	4.484	0.141	0	0	0	-4	7.887	3.443	12.358
53	0.30	25.83	39	3	-1.322	37.69	5.28	-0.04	0	0	0	-4	6.044	3.489	12.681
54	1.84	19.24	26	2	-1.131	26.219	3.625	-0.042	0	0	0	-4	1.777	4.911	24.836
55	1.61	19.24	26	2	-1.132	26.205	3.486	-0.049	0	0	0	-4	2.155	4.911	24.836
56	1.40	18.65	26	2	-1.128	26.091	3.572	-0.043	0	0	0	-4	2.888	4.806	23.8
57	0.97	22.76	34	2	-1.065	32.306	4.506	-0.048	0	0	0	-4	4.385	3.743	14.558
58	0.83	21.73	32	2	-1.076	31.189	4.466	-0.045	0	0	0	-4	5.387	4.851	24.238
59	1.38	20.24	29	2	-1.136	28.94	4.359	-0.038	0	0	0	-4	5.728	5.015	25.886
60	1.38	24.95	33	3	-1.285	32.682	5.232	0.041	0	0	0	-4	2.567	6.073	37.764
61	0.91	26.43	36	3	-1.215	34.327	4.688	0.039	0	0	0	-4	4.165	5.901	35.68
62	1.79	24.83	33	3	-1.263	32.209	4.7	0.044	0	0	0	-4	2.128	5.708	33.414
63	1.18	24.95	33	3	-1.278	32.507	4.784	0.04	0	0	0	-4	2.386	6.073	37.764
64	1.41	25.06	33	3	-1.278	32.561	5.066	0.037	0	0	0	-4	3.456	6.437	42.371
65	1.45	24.95	33	3	-1.264	32.269	4.963	0.041	0	0	0	-4	3.273	6.073	37.764
66	1.47	25.54	33	3	-1.266	32.369	5.297	0.039	0	0	0	-4	2.092	6.169	38.954
67	0.74	26.25	35	3	-1.235	33.669	5.182	0.037	0	0	0	-4	4.618	5.643	32.664
68	1.42	34.59	53	3	-1.044	48.457	5.147	-0.078	0	0	0	-4	10.603	0.973	1.089
69	1.69	29.68	43	3	-1.108	40.191	4.545	-0.07	0	0	0	-4	8.195	2.5	6.617
70	0.99	29.25	43	3	-1.107	40.104	4.96	-0.06	0	0	0	-4	9.955	1.89	3.847
71	1.29	28.77	42	3	-1.107	39.21	4.32	-0.058	0	0	0	-3	9.211	1.89	3.847
72	1.27	22.15	29	3	-1.318	29.458	4.081	-0.031	0	0	0	-4	3.305	4.622	22.042
73	0.85	23.46	31	3	-1.323	31.33	4.639	-0.039	0	0	0	-4	3.866	4.253	18.707
74	1.07	23.04	31	3	-1.321	31.217	4.941	-0.029	0	0	0	-4	5.599	3.714	14.339
75	0.87	32.48	49	3	-1.036	43.681	5.265	-0.077	0	0	0	-4	8.318	1.524	2.546
76	0.28	27.14	39	3	-1.202	37.323	5.212	-0.052	0	0	0	-4	7.781	2.453	6.377
77	0.76	25.57	35	3	-1.255	34.214	4.637	-0.06	0	0	0	-4	4.981	3.693	14.18
78	0.50	25.15	35	3	-1.252	34.055	5.142	-0.048	0	0	0	-4	6.75	3.126	10.231
79	0.62	28.16	38	4	-0.934	28.332	2.514	-0.3	0	0	1	-4	4.14	4.782	23.567
80	0.74	28.16	38	4	-0.924	28.159	2.644	-0.304	0	0	1	-4	5.57	4.782	23.567

81	1.05	28.16	38	4	-1.138	30.792	4.297	-0.299	0	0	1	-4	4.486	4.782	23.567
82	0.68	26.67	35	4	-1.133	28.403	3.845	-0.297	0	0	1	-4	2.463	4.687	22.656
83	1.06	26.67	35	4	-1.046	27.353	2.497	-0.288	0	0	1	-4	4.123	4.687	22.656
84	1.65	26.67	35	4	-1.141	28.544	3.929	-0.298	0	0	1	-4	2.966	4.687	22.656
85	1.13	27.26	35	4	-1.017	27.068	2.767	-0.295	0	0	1	-4	3.429	4.782	23.567
86	1.65	27.26	35	4	-1.012	26.993	2.579	-0.297	0	0	1	-4	2.639	4.782	23.567
87	1.69	27.98	37	4	-1.053	28.985	3.424	-0.303	0	0	1	-4	4.499	4.371	19.745
88	1.10	27.98	37	4	-0.983	28.089	2.927	-0.3	0	0	1	-4	5.748	4.371	19.745
89	1.38	27.07	36	4	-1	27.51	3.011	-0.303	0	0	1	-3	3.921	3.804	15.028
90	1.42	28.49	38	4	-0.94	28.414	3.221	-0.306	0	0	1	-4	3.824	5.063	26.373
91	1.27	33.27	45	4	-1.236	35.021	4.972	-0.378	0	0	1	-4	5.331	4.21	18.337
92	1.70	33.84	45	4	-0.963	30.935	2.505	-0.272	0	0	1	-4	4.985	4.997	25.705
93	1.13	35.55	51	5	-1	36.538	3.308	-0.295	0	0	1	-4	6.069	5.307	28.936
94	0.96	35.35	48	5	-0.99	33.293	3.082	-0.202	0	0	1	-4	5.636	5.681	33.109
95	1.18	10.19	14	1	-0.468	13.616	2.433	-0.161	0	0	0	-3	1.667	4.466	20.602
96	0.65	9.86	14	1	-0.468	13.451	2.031	-0.115	0	0	0	-3	2.166	3.836	15.273
97	0.82	8.37	11	1	-0.631	11.032	2.008	-0.066	0	0	0	-3	0.77	3.98	16.421
98	0.62	8.96	11	1	-0.639	11.164	2.072	-0.118	0	0	0	-3	-0.013	4.104	17.44
99	0.95	8.37	11	1	-0.637	11.069	1.926	-0.115	0	0	0	-3	0.703	3.98	16.421
100	0.70	9.86	14	1	-0.599	13.962	2.751	-0.062	0	0	0	-3	2.411	3.836	15.273
101	0.77	16.57	24	2	-0.651	20.637	3.117	-0.123	0	0	0	-4	1.537	3.771	14.772
102	0.70	18.68	28	2	-0.563	23.822	3.265	-0.124	0	0	0	-4	2.793	3.45	12.407
103	0.29	18.68	28	2	-0.807	26.577	4.107	-0.139	0	0	0	-4	3.36	3.45	12.407
104	0.99	16.57	24	2	-0.879	23.029	3.813	-0.094	0	0	0	-4	3.664	3.771	14.772
105	0.82	16.57	24	2	-0.876	23.105	3.889	-0.144	0	0	0	-4	4.114	3.771	14.772
106	0.66	18.68	28	2	-0.707	25.941	3.874	-0.082	0	0	0	-4	6.079	3.45	12.407
107	0.49	12.46	17	1	-0.828	15.593	3.058	-0.121	0	0	0	-4	-0.003	2.876	8.693
108	0.16	14.57	21	1	-0.821	18.984	4.311	-0.113	0	0	0	-4	2.17	2.306	5.654
109	0.26	15.08	22	1	-0.807	20.006	4.151	-0.136	0	0	0	-3	2.461	1.518	2.527
110	0.62	14.68	21	1	-0.827	19.12	4.105	-0.132	0	0	0	-4	1.261	2.423	6.224
111	0.78	18.79	29	1	-0.517	25.002	3.964	-0.107	0	0	0	-4	7.721	1.206	1.631
112	0.73	16.68	25	1	-0.645	21.615	4.118	-0.142	0	0	0	-3	3.849	1.751	3.321
113	1.26	16.28	24	1	-0.669	20.785	4.062	-0.137	0	0	0	-4	2.637	2.653	7.424
114	1.17	20.38	32	1	-0.436	26.828	3.635	-0.15	0	0	0	-4	5.897	1.429	2.252
115	0.95	15.65	23	1	-0.485	19.015	2.893	-0.122	0	0	0	-4	3.925	3.346	11.685
116	1.05	17.76	27	1	-0.486	22.259	4.322	-0.112	0	0	0	-4	6.153	2.766	8.054
117	1.35	17.87	27	1	-0.495	22.417	4.114	-0.125	0	0	0	-4	5.204	2.878	8.702
118	1.31	15.65	23	1	-0.531	19.162	2.918	-0.117	0	0	0	-4	1.824	3.346	11.685
119	0.47	14.1	21	1	-0.816	18.822	3.843	-0.161	0	0	0	-4	2.435	2.041	4.464
120	0.49	18.21	29	1	-0.683	26.402	3.889	-0.166	0	0	0	-4	6.194	0.853	0.853
121	0.48	20.69	32	1	-0.125	23.592	2.145	-0.213	0	1	0	-4	5.259	1.943	4.06

122	0.24	22.8	36	1	0.128	24.963	2.227	-0.196	0	1	0	-4	7.912	1.41	2.194
123	0.25	24.4	39	1	0.134	27.604	3.021	-0.206	0	1	0	-4	9.302	1.621	2.864
124	0.33	24.4	39	1	0.198	27.45	2.266	-0.199	0	1	0	-4	7.723	1.621	2.864
125	0.26	23.89	38	1	0.232	26.671	1.967	-0.188	0	1	0	-4	7.403	2.369	5.959
126	1.18	24.4	39	1	0.252	27.488	2.13	-0.175	0	1	0	-4	9.094	1.621	2.864
127	0.08	26	42	1	0.392	29.372	2.582	-0.2	0	1	0	-4	10.206	1.829	3.611
128	0.61	27.6	45	1	0.439	31.609	3.086	-0.205	0	1	0	-4	11.058	2.033	4.43
129	0.80	26	42	1	0.439	29.246	1.584	-0.206	0	1	0	-4	8.618	1.829	3.611
130	0.64	31.6	49	2	-0.069	34.86	2.411	-0.087	0	1	0	-4	9.977	2.607	7.177
131	0.61	33.19	52	2	0.004	37.109	2.412	-0.09	0	1	0	-4	9.936	2.797	8.233
132	0.74	15.19	25	1	0.218	19.24	2.231	0.058	0	0	0	-3	3.913	1.988	4.242
133	0.22	30.64	50	4	-0.595	42.863	3.532	-0.261	0	0	0	-2	18.243	-0.889	0.661
134	1.18	7.14	10	1	-0.931	10.586	1.772	0.151	0	0	0	-4	1.649	1.217	1.66
135*	1.64	11.07	15	2	-0.867	15.238	2.473	0.039	0	0	0	-4	2.206	4.338	19.449
136*	0.32	19.24	26	2	-1.133	26.264	3.859	-0.039	0	0	0	-4	2.353	4.911	24.836
137*	0.38	20.47	29	2	-1.14	29.088	4.568	-0.047	0	0	0	-4	2.871	5.221	28.025
138*	1.67	16.57	24	2	-0.754	22.358	2.944	-0.142	0	0	0	-4	1.419	3.771	14.772
139*	0.28	26.56	35	4	-1.138	28.449	4.118	-0.303	0	0	1	-4	2.876	4.592	21.756
140*	0.27	23.58	38	1	-0.147	30.424	4.024	-0.089	0	0	0	-4	10.335	1.863	3.742

* Moléculas excluidas del modelo QSAR

Tabla 2.35. Valores correspondiente a la actividad $Y_{\text{Experimental}}$ ($\text{LogIC}_{50\text{exp.}}$) y Y_{predicha} ($\text{LogIC}_{50\text{Pred.}}$) de las moléculas utilizadas en la ecuación QSAR 1. También se muestran los valores correspondiente a $\text{Residual}_{\text{pred.}}$.

Molécula	Y_{exp}	Y_{pred}	Hat	D.E	$\text{Residual}_{\text{Pred}}$	D.E
1	2.06	-0.53	0.14	0.01	-0.73	0.06
2	1.96	0.35	0.58	0.13	0.25	0.09
3	1.08	-0.65	0.30	0.05	0.13	0.06
4	1.85	-0.03	0.55	0.17	-0.01	0.13
5	0.90	-1.07	0.49	0.10	-0.11	0.04
6	1.65	-0.40	0.34	0.08	-0.20	0.07
7	0.96	-1.11	0.10	0.01	-0.22	0.04
8	1.58	-0.61	0.07	0.01	-0.33	0.04
9	1.10	-1.00	0.16	0.02	-0.24	0.07
10	1.04	-0.47	0.15	0.03	0.34	0.11
11	1.18	-0.38	0.13	0.02	0.30	0.07
12	1.08	-0.66	0.10	0.01	0.12	0.07
13	1.04	-0.39	0.41	0.11	0.42	0.10
14	1.05	-1.45	0.17	0.01	-0.64	0.07
15	1.08	-0.65	0.26	0.04	0.13	0.06
16	1.18	-0.98	0.18	0.02	-0.30	0.09
17	1.15	-1.10	0.13	0.01	-0.39	0.08
18	1.04	-0.90	0.12	0.01	-0.08	0.08
19	0.79	-0.99	0.10	0.01	0.08	0.08
20	0.95	-0.88	0.12	0.02	0.02	0.09
21	0.66	-1.16	0.12	0.01	0.03	0.04
22	0.39	-1.01	0.10	0.01	0.46	0.04
23	1.15	-0.92	0.13	0.01	-0.21	0.05
24	1.05	-1.17	0.14	0.02	-0.36	0.04
25	0.95	-1.11	0.15	0.01	-0.20	0.08
26	1.26	-1.03	0.14	0.01	-0.43	0.05
27	0.88	-0.63	0.50	0.15	0.35	0.27
28	0.15	-1.35	0.22	0.02	0.36	0.09
29	2.69	0.60	0.27	0.06	-0.23	0.13
30	2.86	0.72	0.24	0.06	-0.28	0.06
31	2.74	0.90	0.27	0.05	0.02	0.11
32	2.83	0.77	0.46	0.10	-0.20	0.12
33	2.50	0.38	0.40	0.15	-0.26	0.12
34	2.51	1.08	0.23	0.05	0.43	0.03
35	2.88	0.89	0.25	0.06	-0.13	0.09
36	2.94	1.28	0.30	0.05	0.20	0.10
37	1.86	-0.21	0.35	0.07	-0.21	0.07

38	2.15	0.51	0.32	0.08	0.22	0.17
39	2.16	-0.28	0.10	0.02	-0.58	0.11
40	1.17	-1.19	0.52	0.14	-0.51	0.11
41	0.93	-0.48	0.11	0.02	0.46	0.06
42	1.38	-0.35	0.17	0.03	0.13	0.09
43	1.76	-0.30	0.21	0.04	-0.20	0.11
44	0.77	-0.70	0.18	0.03	0.39	0.07
45	1.38	-0.39	0.12	0.03	0.09	0.07
46	1.53	-0.35	0.12	0.02	-0.02	0.07
47	1.83	-0.39	0.11	0.02	-0.36	0.08
48	0.68	-0.45	0.20	0.04	0.73	0.16
49	1.43	-0.63	0.08	0.01	-0.20	0.07
50	1.55	-0.59	0.08	0.01	-0.29	0.07
51	1.89	-0.51	0.10	0.01	-0.54	0.07
52	0.76	-0.82	0.29	0.05	0.28	0.17
53	0.30	-1.10	0.14	0.03	0.46	0.08
54	1.84	-0.54	0.08	0.00	-0.52	0.03
55	1.61	-0.54	0.10	0.00	-0.30	0.02
56	1.40	-0.65	0.09	0.00	-0.19	0.02
57	0.97	-0.72	0.08	0.01	0.16	0.06
58	0.83	-0.64	0.13	0.02	0.39	0.04
59	1.38	-0.73	0.14	0.01	-0.25	0.04
60	1.38	-0.55	0.14	0.01	-0.07	0.08
61	0.91	-0.46	0.12	0.01	0.48	0.06
62	1.79	-0.58	0.11	0.01	-0.50	0.05
63	1.18	-0.46	0.14	0.01	0.22	0.06
64	1.41	-0.50	0.21	0.02	-0.05	0.08
65	1.45	-0.57	0.14	0.01	-0.17	0.08
66	1.47	-0.50	0.18	0.01	-0.12	0.10
67	0.74	-0.57	0.11	0.01	0.56	0.04
68	1.42	-0.68	0.18	0.02	-0.24	0.14
69	1.69	-0.86	0.15	0.02	-0.69	0.03
70	0.99	-0.97	0.13	0.02	-0.10	0.07
71	1.29	-0.77	0.18	0.03	-0.20	0.08
72	1.27	-0.87	0.09	0.01	-0.29	0.06
73	0.85	-0.88	0.11	0.01	0.12	0.05
74	1.07	-1.12	0.13	0.01	-0.34	0.07
75	0.87	-0.94	0.13	0.01	0.05	0.11
76	0.28	-0.98	0.12	0.02	0.60	0.06
77	0.76	-0.88	0.12	0.02	0.21	0.05
78	0.50	-1.08	0.13	0.02	0.28	0.06

79	0.62	-0.51	0.11	0.01	0.73	0.08
80	0.74	-0.61	0.11	0.01	0.51	0.05
81	1.05	-0.65	0.13	0.01	0.15	0.03
82	0.68	-0.58	0.12	0.01	0.60	0.04
83	1.06	-0.47	0.13	0.01	0.33	0.06
84	1.65	-0.69	0.12	0.01	-0.48	0.02
85	1.13	-0.45	0.12	0.01	0.28	0.06
86	1.65	-0.43	0.13	0.01	-0.22	0.04
87	1.69	-0.67	0.10	0.01	-0.50	0.04
88	1.10	-0.63	0.12	0.01	0.13	0.08
89	1.38	-0.64	0.14	0.01	-0.17	0.07
90	1.42	-0.63	0.10	0.01	-0.19	0.02
91	1.27	-0.85	0.16	0.02	-0.25	0.05
92	1.70	-0.48	0.19	0.03	-0.31	0.07
93	1.13	-1.12	0.29	0.03	-0.40	0.09
94	0.96	-0.79	0.22	0.03	0.11	0.04
95	1.18	-0.79	0.10	0.01	-0.12	0.08
96	0.65	-0.73	0.08	0.01	0.48	0.06
97	0.82	-0.76	0.07	0.01	0.28	0.06
98	0.62	-0.71	0.08	0.01	0.53	0.09
99	0.95	-0.82	0.09	0.01	0.09	0.08
100	0.70	-0.77	0.07	0.01	0.39	0.04
101	0.77	-1.28	0.10	0.01	-0.19	0.07
102	0.70	-1.19	0.08	0.01	-0.03	0.05
103	0.29	-1.11	0.05	0.01	0.46	0.04
104	0.99	-1.18	0.04	0.00	-0.31	0.02
105	0.82	-1.29	0.05	0.00	-0.25	0.02
106	0.66	-1.09	0.04	0.00	0.11	0.01
107	0.49	-0.99	0.07	0.00	0.38	0.06
108	0.16	-1.13	0.11	0.01	0.57	0.05
109	0.26	-0.96	0.11	0.01	0.63	0.04
110	0.62	-1.07	0.10	0.01	0.16	0.05
111	0.78	-0.86	0.14	0.02	0.22	0.05
112	0.73	-0.97	0.10	0.01	0.16	0.05
113	1.26	-1.09	0.08	0.00	-0.49	0.05
114	1.17	-0.81	0.09	0.01	-0.12	0.04
115	0.95	-0.91	0.06	0.01	0.00	0.05
116	1.05	-1.16	0.13	0.01	-0.35	0.05
117	1.35	-1.07	0.09	0.00	-0.57	0.03
118	1.31	-0.86	0.05	0.00	-0.32	0.02
119	0.47	-1.22	0.09	0.00	0.17	0.03

120	0.49	-0.82	0.15	0.02	0.55	0.05
121	0.48	-1.40	0.15	0.02	-0.02	0.06
122	0.24	-1.44	0.15	0.01	0.18	0.06
123	0.25	-1.54	0.15	0.01	0.07	0.05
124	0.33	-1.33	0.14	0.02	0.21	0.05
125	0.26	-1.23	0.14	0.01	0.37	0.06
126	1.18	-1.36	0.14	0.01	-0.68	0.05
127	0.08	-1.34	0.15	0.01	0.44	0.05
128	0.61	-1.42	0.16	0.01	-0.17	0.03
129	0.80	-1.15	0.18	0.02	-0.09	0.07
130	0.64	-1.38	0.18	0.01	-0.17	0.03
131	0.61	-1.26	0.21	0.02	-0.01	0.02
132	0.74	-0.43	0.10	0.02	0.69	0.06
133	0.22	-1.65	0.73	0.29	0.00	0.21
134	1.18	-0.73	0.21	0.05	-0.05	0.09

D.E. = Desviación estándar

Validación estadística del modelo QSAR

Una vez que se generó el modelo matemático mediante el programa MobyDigs se realizó la validación estadística de los parámetros arrojados por el programa. El coeficiente de correlación validado cruzado que se denota como Q_{LOO}^2 , el Coeficiente de determinación representado como R^2 , el error estándar de la estimación expresado como s , la función de Fisher indicado como F , la regla Quick expresada como Dk , la regla de la Q^2 asintótica o DQ , la regla de redundancia Rp y de sobreajuste Rn .¹

Uno de los parámetros más importantes es la varianza en la predicción del modelo, adquirida del valor del coeficiente de correlación Q^2 . El valor analizado (Q_{LOO}^2) se calcula utilizando el método (Leave-one-out, LOO) “Dejar uno afuera”; basado en generar dos conjuntos de moléculas, el conjunto de entrenamiento, que consta de $n-1$ moléculas y el conjunto de validación que corresponde a una molécula eliminada del conjunto total.^{1,2} La ecuación que define a Q_{LOO}^2 es la siguiente:

$$Q_{LOO}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{En donde } y_{ii} \text{ es el valor de la molécula } i$$

cuando esta se excluye durante el proceso de entrenamiento.

Mientras que la Regla de la Q^2 asintótica o Q_{ASYM}^2 es utilizada como un parámetro para validar la capacidad predictiva del modelo y surge del principio “Un buen modelo QSAR deberá tener una pequeña diferencia entre su habilidad

descriptiva y predictiva”. Además de que se ha demostrado que Q_{LOO}^2 está relacionada con R^2 de manera asintótica, por lo que Q_{ASYM}^2 está dada por la siguiente ecuación:

$$Q_{ASYM}^2 = 1 - (1 - R^2) \left(\frac{n}{n - p'} \right)^2 \quad \text{Donde } n \text{ es el número de moléculas y } p' \text{ es el}$$

número de variables o descriptores en el modelo.

La regla establece que si $Q_{LOO}^2 - Q_{ASYM}^2 < \delta Q$ el modelo es rechazado; y los valores de δQ están en el rango de -0.005 a 0.005.

La regla Quick es capaz de ayudar a rechazar modelos con alta capacidad predictiva, se basa en el índice de correlación multivariable K que mide la correlación total de un conjunto de variables (Descriptores) y lo compara con el índice de correlación multivariante KXY (X-Descriptores moleculares y $Y_{Actividad\ biológica}$),³ se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$K = \frac{\sum_j \left[\frac{\lambda_j}{\sum_j \lambda_j} - \frac{1}{p} \right]}{\frac{2(p-1)}{p}} \quad j = 1, 2, 3, \dots, p \quad 0 \leq K \leq 1$$

En donde λ_j es el valor obtenido de la correlación de los datos $X(n, p)$ de la matriz: $\lambda_j = 1 + (1 - p) p_j$

Y n es el número de moléculas, p es el número de variables (descriptores moleculares) y p_j es un elemento de la matriz de la correlación de los descriptores.

Los modelos con una correlación K_{XY} más grande que la correlación K_X pueden ser aceptados, de lo contrario si $K_{XY} - K_X < \delta K$ el modelo se rechaza.⁴

El siguiente parámetro estadístico corresponde a R^2 , pertenece al coeficiente de determinación, es útil para determinar qué tan factible es nuestro modelo. Lo anterior, debido a que relaciona la respuesta observada (Actividad biológica experimental de interés) con la respuesta calculada, mediante nuestro modelo y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{n=1}^n (\hat{y} - y_i)^2}{\sum_{n=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

En donde \hat{y} es el valor de la respuesta observada (Actividad biológica experimental), y_i es la respuesta calculada generada por el modelo y \bar{y} es el promedio de la respuesta observada.^{5,6}

R^2 es expresada como un valor en porcentaje $0 \leq R^2 \leq 100$. Si se continúa incrementando el número de descriptores en un modelo para un número de observaciones, los valores de R^2 aumentarán, pero esto puede disminuir los grados de libertad y bajar la fiabilidad estadística del modelo. Así, un alto valor de R^2 no es necesariamente un indicativo de un buen modelo estadístico que se ajuste a los datos disponibles.⁷ Para reflejar esta variación de una mejor manera, se usa el parámetro de R^2 ajustada identificada como R^2_a o R^2_{adj} , definida por la siguiente ecuación:

$$R^2_{adj} = \frac{(N-1) \cdot R^2 - p}{N-1-p}$$

Donde p es el número de variables (descriptores) usados en el modelo desarrollado y N es el número de objetos (moléculas).

El siguiente parámetro es la regla de Fisher denotada como F y está dada por la siguiente ecuación:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / df_M}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 / df_E}$$

Donde n representa el número de moléculas en el estudio, y_i es el valor calculado, \hat{y}_i es el valor experimental y \bar{y} es el valor promedio de los valores de actividad biológica, df_M y df_E , se refieren al grado de libertad del modelo y de error.^{1,5}

La desviación estándar s , es otro parámetro estadístico que está relacionado con la buena predicción del modelo. Para un buen modelo, la desviación estándar de la estimación de y debe ser bajo, y esto es definido de la siguiente manera:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{N - p - 1}}$$

Donde \hat{y}_i es el valor de la respuesta observada (experimental, actividad biológica), y_i es la respuesta calculada derivada del modelo, la parte del denominador $(N - p - 1)$ representa los grados de libertad del modelo (df_M) donde N es el número de moléculas y p el número de descriptores moleculares.^{1,5} Cabe señalar que valores pequeños de s y valores altos de F indican modelos confiables.

Por último, están las reglas basadas en la función R cuyo objetivo es rechazar modelos con exceso de buenos descriptores, así como modelos con un exceso de malos descriptores. Tomando en cuenta un modelo de regresión con p variables, sea R_{jy} el valor absoluto del coeficiente de correlación entre el j -ésimo descriptor y la respuesta Y :

$$M_j = \frac{R_{jy}}{R} - \frac{1}{p} \quad -\frac{1}{p} \leq M_j \leq \frac{p-1}{p}$$

Donde el valor de R_{jy} representa la correlación entre el descriptor (j -ésimo) y la respuesta y (actividad biológica), R es el valor de la correlación multivariante total.

Las reglas de redundancia (R^p) y sobreajuste (R^N) para la validación de un modelo están basadas en las reglas de la función R . La regla de redundancia estipula que si $R^p < t^p$ entonces el modelo es rechazado. Dependiendo de los datos corresponde el valor de t^p , y este valor oscila entre 0.01 a 0.1, un valor sugerido es $t^p = 0.05$.

R^p se define de la siguiente manera:

$$P^2 = \prod_{j=1}^{p+} \left(1 - M_j \left(\frac{p}{p-1} \right) \right) M_j > 0 \text{ y } 0 \leq R^N \leq 1$$

Mientras que la regla de sobreajuste estipula que $R^N < t^N$ (ϵ), entonces el modelo es rechazado.⁴ R^N se calcula de la manera siguiente:

$$R^N = \sum_{j=1}^{p-} M_j \quad M_j < 0 \text{ y } -1 < R^N \leq 0$$

Es importante mencionar que el valor de ε puede ser ajustado, dependiendo del conocimiento que se tiene con respecto a las variables ruido en el modelo relacionado con la respuesta Y (actividad biológica). Por otra parte, se puede suponer que no más de una variable ruido se permite en el modelo, por lo tanto, un valor de $t^N(\varepsilon)$ para R^N se puede calcular con la siguiente formula:⁴

$$t^N(\varepsilon) = \frac{p \cdot \varepsilon - R}{p \cdot R}$$

Donde el valor de ε va de 0.01 a 0.1, p representa el número de descriptores en el modelo. El producto de R^P se lleva a cabo sobre las variables $p+$, dando una diferencia M_j , mientras que la suma en R^N sobre las variables $p-$ dan una diferencia negativa.

1. Noolvi MN, Patel HM. A comparative QSAR analysis and molecular docking studies of quinazoline derivatives as tyrosine kinase (EGFR) inhibitors: A rational approach to anticancer drug design. *J Saudi Chem Soc.* 2013 Oct;17(4):361–79.
2. Consonni V, Ballabio D, Todeschini R. Evaluation of model predictive ability by external validation techniques. *J Chemom.* 2010 Mar;24(3–4):194–201.
3. Todeschini R, Consonni V, Maiocchi A. The K correlation index: theory development and its application in chemometrics. Vol. 46, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 1998.
4. Todeschini R, Consonni V, Mauri A, Pavan M. Detecting “bad” regression models: Multicriteria fitness functions in regression analysis. *Anal Chim Acta.* 2004;515:199–208.
5. Montgomery DPE and VG. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL. Tercera (i. Callejas JE and REP, editor. México: COMPAÑÍA EDITORIAL CONTINENTAL; 2006. 1–76 p.
6. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. Vol. 29, *Molecular Informatics.* 2010. p. 476–88.
7. Steinmetz FP, Madden JC, Cronin MTD. Data Quality in the Human and Environmental Health Sciences: Using Statistical Confidence Scoring to Improve QSAR/QSPR Modeling. *J Chem Inf Model.* 2015 Aug 24;55(8):1739–46.

CAPÍTULO III

Síntesis y purificación de nuevos derivados de AG (N1-N9)

En este capítulo se detallan las metodologías de reacción para la obtención de los derivados semisintéticos del ácido gálico y la identificación de cada uno de los compuestos obtenidos.

3.1 MÉTODOS QUÍMICOS

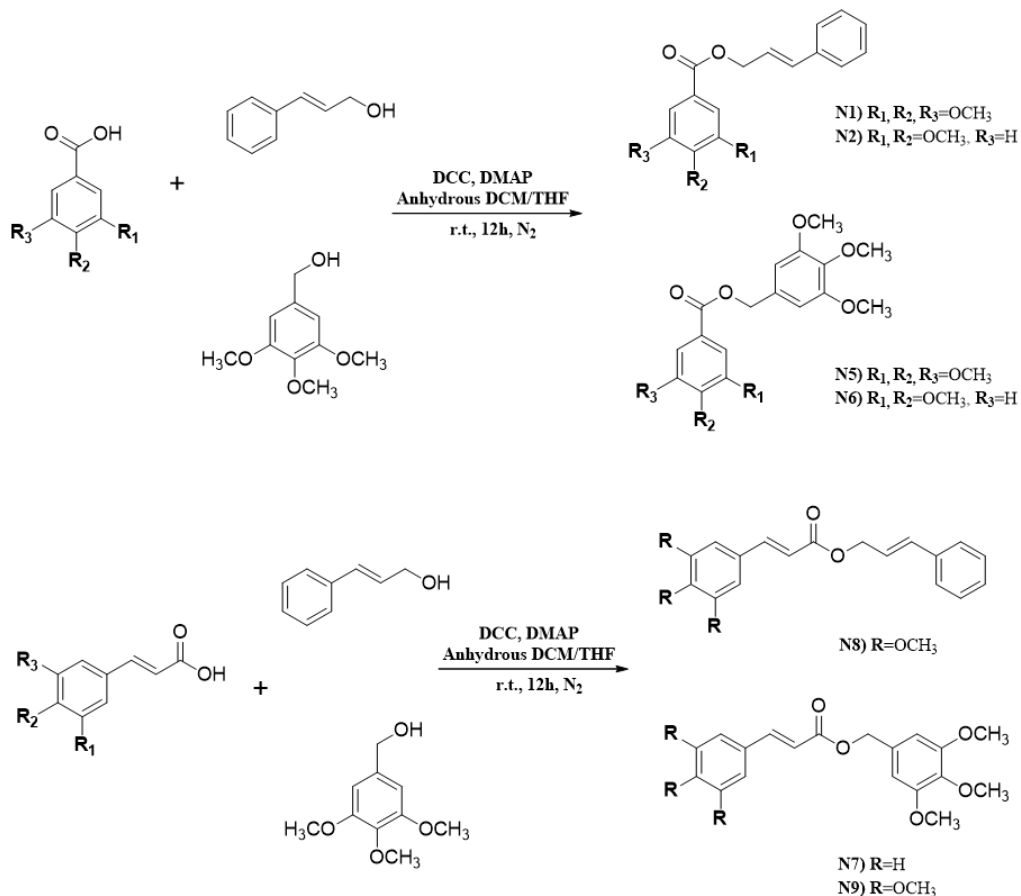
3.1.1 Método general

Los reactivos y disolventes disponibles en el mercado se obtuvieron de Sigma-Aldrich y fueron de grado analítico. Todas las reacciones en las que intervienen materiales sensibles al aire o a la humedad se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno. El progreso de las reacciones se observó mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatofolios de aluminio de silicagel 60 F254 marca Merck dotados con indicador UV a 254 nm. Para purificar los productos de reacción se realizaron cromatografías en columna abierta sobre gel de sílice 60 (malla 70-230 y 230-400), utilizándose diferentes sistemas de disolventes como fase móvil para la purificación (n-hexano y EtOAc). Los espectros de RMN se registraron con un instrumento Varian System (400 MHz para ^1H , y 100 MHz para ^{13}C), empleando CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna; los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz. Las multiplicidades se indican como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), doble de doble (dd) y multiplete (m). Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Joel M-station JEOL JMX-AX 505 HA.

3.1.2 Síntesis general de los derivados del ácido gálico

3.1.2.1 Procedimiento general para la preparación de los ésteres N1, N2 y N5-N7

La síntesis de los compuestos **N1**, **N2**, **N5**, **N6** y **N7** se llevó a cabo mediante reacciones de esterificación de Steglich (esquema 3.1), que utiliza DCC (N-N'-Diciclohexilcarbodiimida) como agente de acoplamiento y DMAP (4-Dimetilaminopiridina) como catalizador. Esta síntesis se llevó a cabo en dos etapas.¹ En la primera etapa, el ácido carboxílico se colocó en un matraz junto con 1.5 equivalentes de DCC y 1 equivalente de DMAP, lo anterior se disolvió en 6 ml de DCM (diclorometano) anhidro y la mezcla se agitó durante media hora, a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno (N₂). En la segunda etapa, se disolvió 1 equivalente del alcohol de interés en 6 mL de THF (tetrahidrofurano) anhidro, esta solución se añadió gota a gota a la mezcla generada en la primera etapa. La reacción se monitoreo durante 12 horas mediante cromatografía en capa fina (CCF) y una mezcla de Hexano:AcOEt (6:4) como eluyente. Al final, el crudo de la reacción se filtró y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando la mezcla Hexano:AcOEt como sistema de elución (95:05 → 85:15).



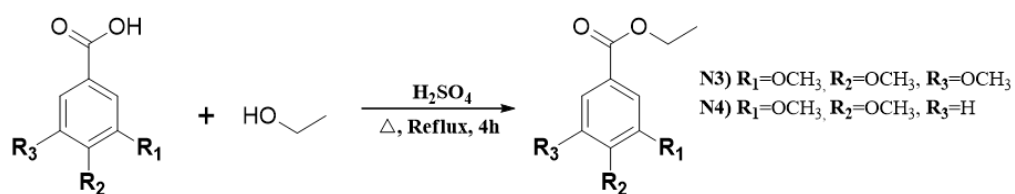
Esquema 3.1. Síntesis de los análogos de aril galatos

3.1.2.2. Procedimiento general para la semisíntesis de los compuestos N3 y

N4.

La síntesis de los compuestos **N3** y **N4** se realizó siguiendo el procedimiento de esterificación de Fischer² (esquema 3.2). Brevemente: A una solución del ácido carboxílico en 15 mL de etanol, se añadieron lentamente 0.2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). La mezcla de reacción se sometió a reflujo con agitación durante 4 horas. La reacción se monitorizó por TLC con una mezcla de hexano: acetato de etilo (60:40) como eluyente. La extracción se realizó

con 10 mL de agua destilada y 10 mL (2x) de acetato de etilo. Posteriormente, se neutralizó con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 5%, el crudo de la reacción se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), se filtró y el disolvente se evaporó utilizando un evaporador rotatorio. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna de Si-gel con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (85:15).



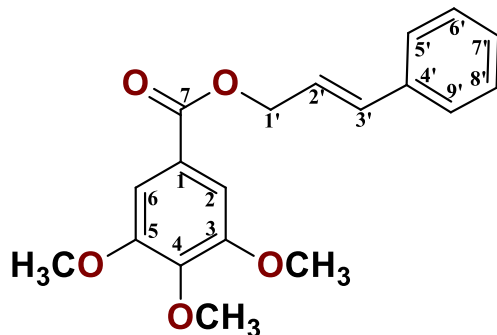
Esquema 3.2. Síntesis de 3, 4, 5-trimetoxibenzoato de etilo (N3) y 3, 4-dimetoxibenzoato de etilo (N4)

3.1.3. Estabilidad de los compuestos N1-N9

La estabilidad de los compuestos sintetizados se analizó al someterlos a condiciones equivalentes a las generadas durante su evaluación *in vitro*. Pero solo se tomó en cuenta una concentración para cada uno de los compuestos, 100 µg/mL, esta dilución se realizó con el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la línea celular HeLa. Posteriormente, 100 µL de estas diluciones fueron colocados en una caja de 96 pozos por triplicado. La caja multipozos se incubó durante 72 h, a 37°C y con una atmosfera de 5% de CO₂. Después del tiempo de incubación se analizaron las muestras de cada pozo mediante CCF en un sistema de elución 6:4 (hexano-AcOEt.). La visualización de las placas cromatográficas se realizó mediante una lampara UV (250 nm) y un revelado con sulfato cérico.

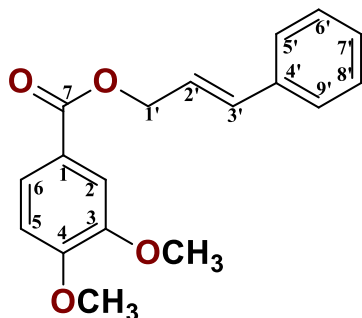
3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1.1. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de cinamilo (N1).



Rendimiento del 71 %. Cristales blancos. Punto de fusión de 83.33°C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ : 7.41 (2H, m, H-5', H-9'), 7.32 (2H, m, H-6', H-8'), 7.32 (2H, s, H-2, H-6), 7.27 (1H, m, Hz, H-7'), 6.73 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3'), 6.40 (1H, dt, $J = 15.9, 6.5$ Hz, H-2'), 4.96 (2H, dd, $J = 6.5, 1.2$ Hz, H-1'), 3.90 (6H, s, OCH_3 -3,5), 3.90 (3H, s, OCH_3 -4). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3), δ : 166.16 (COO-7), 153.03 (C-3, C-5), 142.30 (C-4), 136.26 (C-4'), 134.61 (C-3'), 128.75 (CH-6', CH-8'), 128.27 (C-7'), 126.75 (CH-5', CH-9'), 125.29 (C-1), 123.34 (CH-2'), 106.93 (CH-2, CH-6), 65.89 (CH_2 -1'), 61.04 (OCH_3 -4), 56.35 (OCH_3 -3,5). HRMS (m/z), FAB^+ : 329.1350 $[M]^+$, calc. 328.1311.

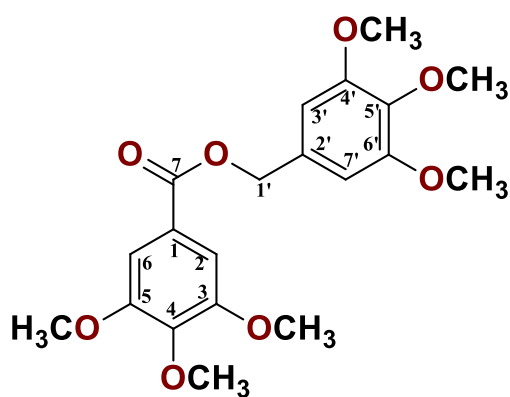
3.2.1.2. 3,4-Dimetoxibenzoato de cinamilo (N2).



Rendimiento del 75%. Cristales Amarillos. Punto de fisión 48.66°C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.73 (1H, dd, $J = 8.4, 2$ Hz, H-6,), 7.58 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-2), 7.42 (2H, m, H-5', H-9'), 7.33 (2H, m, H-6', H-8'), 7.27 (1H, m, H-7'), 6.89 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.74 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3'), 6.41 (1H, dt, $J = 15.9$ Hz, 6.4 H-2'), 4.97 (2H, dd, $J = 6.4, 1.3$ Hz, H-1'), 3.94 (6H, s, OCH_3 -3,4). ^{13}C NMR. 100 MHz, CDCl_3) δ :

166.14 (COO-7), 153.00 (C-4), 148.59 (C-3), 136.22 (C-4'), 134.14 (CH-3'), 128.58 (CH-6', 8'), 128.04 (CH-7'), 126.60 (CH-5', 9'), 123.66 (CH-6), 123.45 (CH-2'), 122.66 (C-1), 111.98 (CH-2), 110.22 (CH-5), 65.41 (CH₂-1'), 55.98 (OCH₃-3,4). HRMS (*m/z*), FAB⁺: 298.1195 [*M*]⁺, calc. 298.1205.

3.2.1.3. 3,4,5-Trimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N5)

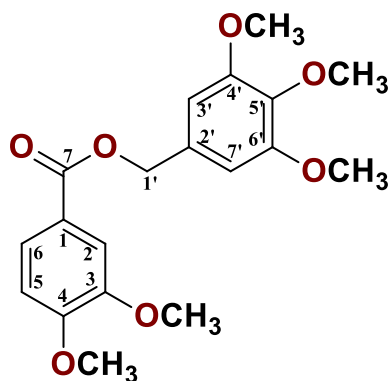


Rendimiento del 68%. Cristales

Blancos. Punto de fusión de 85.66°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 7.33 (2H, s, H-6, H-2), 6.68 (2H, s, H-3', H-7'), 5.29 (2H, s, H-1'), 3.91 (3H, s, OCH₃-4), 3.90 (6H, s, OCH₃-5,3), 3.88 (6H, s, OCH₃-

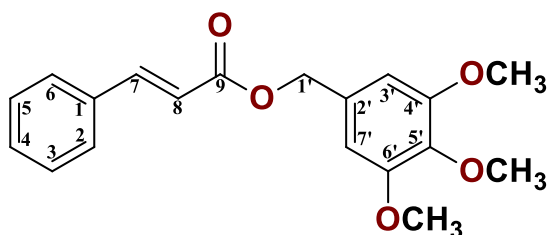
4',6'), 3.86 (3H, s, OCH₃-5'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ: 166.07 (C-7), 153.33 (C-4', C-6'), 152.94 (C-3, C-5), 142.36 (C-4), 137.96 (C-5'), 131.64 (C-2'), 125.04 (C-1), 106.93 (CH-2, CH-6), 105.44 (CH-3', CH-7'), 67.03 (CH₂-1'), 60.92 (OCH₃-4), 60.84 (OCH₃-5'), 56.25 (OCH₃-3,5), 56.13 (OCH₃-4',6'). HRMS (*m/z*), FAB⁺: 392.1399 [*M*]⁺, calc. 392.1471.

3.2.1.4. 3,4-Dimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N6)



Rendimiento del 61%. Cristales blancos, Punto de fusión de 94.66°C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ : 7.72(1H, dd, $J = 8.4, 2$ Hz, H-6), 7.58(1H, d, $J = 2$ Hz, H-2), 6.89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.68 (2H, s, H-3', H-7'), 5.27 (2H, s, H-1'), 3.94 (3H, s, OCH_3 -4), 3.93(3H, s, OCH_3 -3), 3.88 (6H, s, OCH_3 -4',6'), 3.85 (3H, s, OCH_3 -5'). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ : 166.46 (C-7), 153.56 (C-4', C-6'), 153.36 (C-4), 148.89 (C-3), 138.15 (C-5'), 132.06 (C-2'), 123.94 (C-6), 122.79 (C-1), 112.31 (CH-2), 110.48 (CH-5), 105.65 (CH-3', CH-7'), 67.01 (CH₂-1'), 61.07 (OCH_3 -5'), 56.37 (OCH_3 -4',6') 56.25 (OCH_3 -3,4). HRMS (m/z), FAB⁺: 363.1445 [M]⁺, calc. 362.1366.

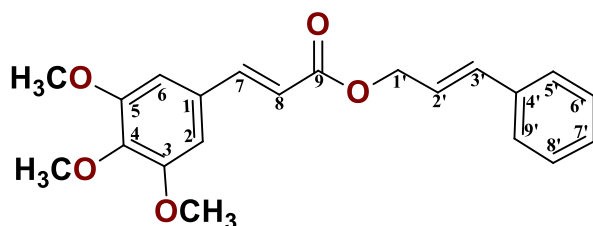
3.2.1.5. Cinamato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N7)



Rendimiento del 84%. Cristales blancos. Punto de fusión 84.6 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ : 7.74 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-7), 7.53 (2H, m, H-2, H-6), 7.39 (3H, m, H-3, H-4, H-5), 6.65 (2H, s, H-3', H-7'), 6.50 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 5.18 (2H, s, H-1'), 3.88 (6H, s, OCH_3 -4',6'), 3.85 (3H, s, OCH_3 -5'). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ : 167.00 (C-9), 153.57 (C-4', C-6'), 145.54 (CH-7), 138.20 (C-5'), 134.50 (C-1), 131.78 (C-2'), 130.63 (CH-4), 129.12 (CH-3, CH-5), 128.32 (CH-2,

CH-6), 117.98(CH-8), 105.79 (CH-3', CH-7'), 66.85 (CH₂-1'), 61.04 (OCH₃-5'), 56.35 (OCH₃-4',6'). HRMS (*m/z*), FAB⁺: 329.1407 [*M*]⁺, calc. 328.1311.

3.2.1.6. 3,4,5-Trimetoxicinamato de cinamilo (N8)



Rendimiento del 82%. Crsitales

blancos. Punto de fusión de 86.2°C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ: 7.65

(1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7), 7.42 (2H, m,

H-5', H9'), 7.33 (2H, m, H-6', H-8'), 7.27 (1H, m, H-7'), 6.76 (1H, s, H-2, H-6), 6.71

(1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-3'), 6.39 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 6.36 (1H, m, H-2'), 4.87

(2H, dd, *J* = 1.3, 6.4 Hz, H-1'), 3.89 (6H, s, OCH₃-3,5), 3.88 (3H, s, OCH₃-4). ¹³C

NMR (125 MHz, CDCl₃), δ: 166.88 (C-9), 153.65 (C-3, C-5), 145.28 (C-7), 140.38

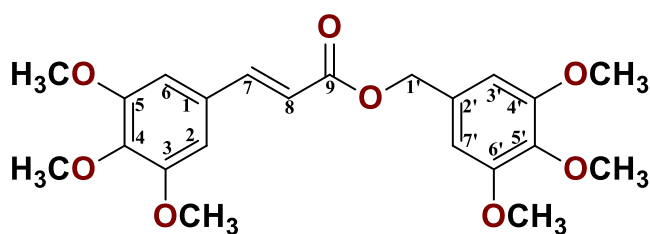
(C-4), 136.43 (C-4'), 134.54 (CH-3'), 130.08 (CH-1), 128.83 (CH-6',8'), 128.31 (C-

7'), 126.84 (CH-5', 9'), 123.45 (CH-2'), 117.35 (CH-8), 105.46 (C-2,6), 65.35

(CH₂-1'), 61.18 (OCH₃-4), 56.36 (3,5-OCH₃). HRMS (*m/z*), FAB⁺: 355.1506 [*M*]⁺,

calc. 354.1467.

3.2.1.7. 3,4,5-Trimetoxicinamato de 3,4,5-trimetoxibencilo (N9)



Rendimiento del 85%,

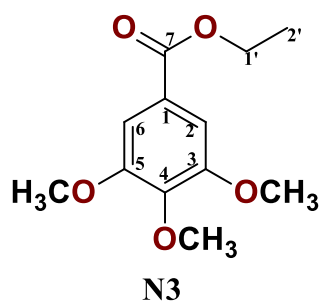
Polvo ligeramente amarillo. Punto

de fusión de 98.25. ¹H NMR (500

MHz, CDCl₃), δ: 7.65 (1H, d, *J* = 15.9

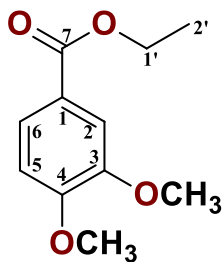
Hz, H-7), 6.78 (2H, s, H-2, H-6), 6.67 (2H, s, H-3', H-7'), 6.42 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.18 (2H, s, H-1'), 3.89 (6H, s, OCH₃-3,5), 3.89 (6H, s, OCH₃-4', 6'), 3.88 (3H, s, OCH₃-4), 3.85 (3H, s, OCH₃-5'), ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ : 167.20 (C-9), 153.53 (C-4', C-6'), 153.44 (C-3, C-5), 145.66 (CH-7), 140.26 (C-4), 138.02 (C-5'), 131.78 (C-2'), 130.03 (C-1), 117.07 (CH-8), 105.88 (CH-3', 7'), 105.52 (CH-2,6), 66.95 (CH₂-1'), 61.07 (OCH₃-4), 60.95 (OCH₃-5'), 56.26 (OCH₃-3,5,4',6'). HRMS (m/z), FAB⁺:419.3055 [M]⁺, calc. 418.1628.

3.2.1.8 3,4,5-Trimetoxibenzoato de etilo (N3)



Rendimiento del 93%. Cristales blancos. Punto de fusión de 44.33°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), δ : 7.30 (2H, s, H-2, H-6), 4.38 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-1'), 3.91 (6H, s, OCH₃-3,5), 3.91 (3H, s, OCH₃-4) 1.40 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, CH₃-2'). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ : 166.15 (C-7), 153.09 (C-3, C-5), 142.28 (C-4), 125.72 (C-1), 106.93 (CH-2, CH-6), 61.30 (C-1'), 61.09 (OCH₃-4), 56.41 (OCH₃-3,5), 14.57 (C-2'). HRMS (m/z), FAB⁺: 241.1080 [M]⁺, calc. 240.0998.

3.2.1.9 3,4-Dimetoxibenzoato de etilo (N4)



Rendimiento del 87%. Líquido viscoso incoloro. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ : 7.58 (1H, dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, H-6), 7.45 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 6.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 4.25 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, H-1'), 3.83 (3H, s, OCH₃-3), 3.82 (3H, s, OCH₃-4), 1.29 (3H, t, $J =$

7.1 Hz, CH₃-2'). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃), δ: 166.34 (C-7), 152.88 (C-4), 148.58 (C-3), 123.47 (C-6), 123.02 (C-1), 111.94 (C-2), 110.22 (C-5), 60.76 (C-1'), 55.94 (OCH₃-3,4), 14.38 (C-2'). HRMS (*m/z*), FAB⁺: 211.0946 [*M*]⁺, calc. 210.0892.

3.2.2 Estabilidad de los derivados del AG

Después de 72 h de incubación de los compuestos se observó mediante CCF que no se modificó el R_f de elución, es decir, se mantuvo la relación entre las distancias recorridas por el compuesto y por el eluyente desde el inicio de la placa (figura 3.1).

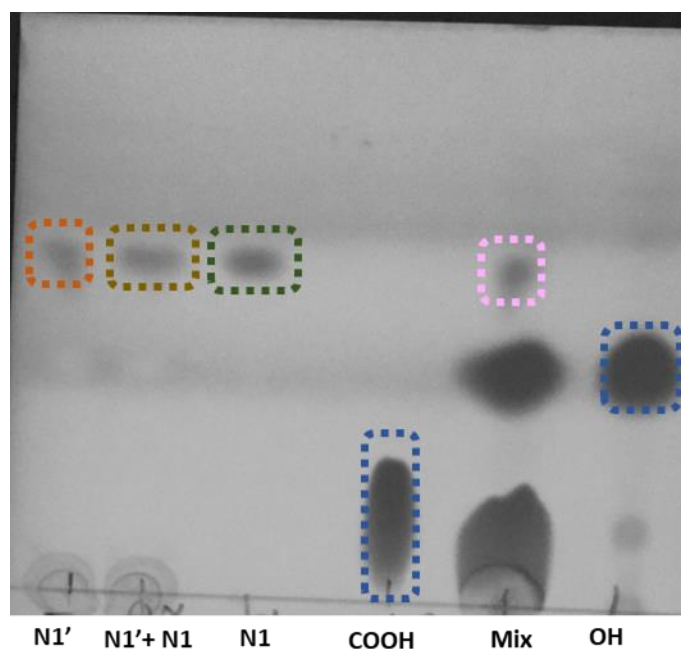


Figura 3.1. Estabilidad del compuesto N1 en condiciones de cultivo celular. N1' corresponde a la elución del compuesto N1 después de 72h de incubación (Naranja). N1'+N1, representan un punto cruzado de elución entre el compuesto en ambas condiciones (Café). COOH concierne a la elución del ácido 3,4,5-Trimetoxi benzoico (Azul). OH corresponde al alcohol cinámico (Azul). Mix es un punto de cruce entre la materia prima de la reacción y N1' (Rosa).

Podemos observar que el compuesto **N1** después de estar en incubación por 72 h (**N1'**) no cambia su Rf ni coloración. Al comparar el Rf de las materias primas para la obtención de **N1** (Ácido trimetoxi benzoico y cinamil alcohol) se observó que no hay degradación del compuesto **N1**. Por lo tanto, sugerimos que este compuesto no se ve afectado al estar en interacción con el medio de cultivo celular durante 72 h de incubación. Este mismo procedimiento se realizó en los ocho compuestos restantes y los resultados fueron similares, es decir, no hay degradación de los compuestos.

3.3 CONCLUSIONES

Hemos sintetizado una serie de nueve nuevos derivados de ésteres de galato y cinamato (**N1-N9**) empleando las reacciones descritas en los esquemas 3.1 y 3.2.

Todos los compuestos se obtuvieron en rendimientos medios y altos (61-93%).

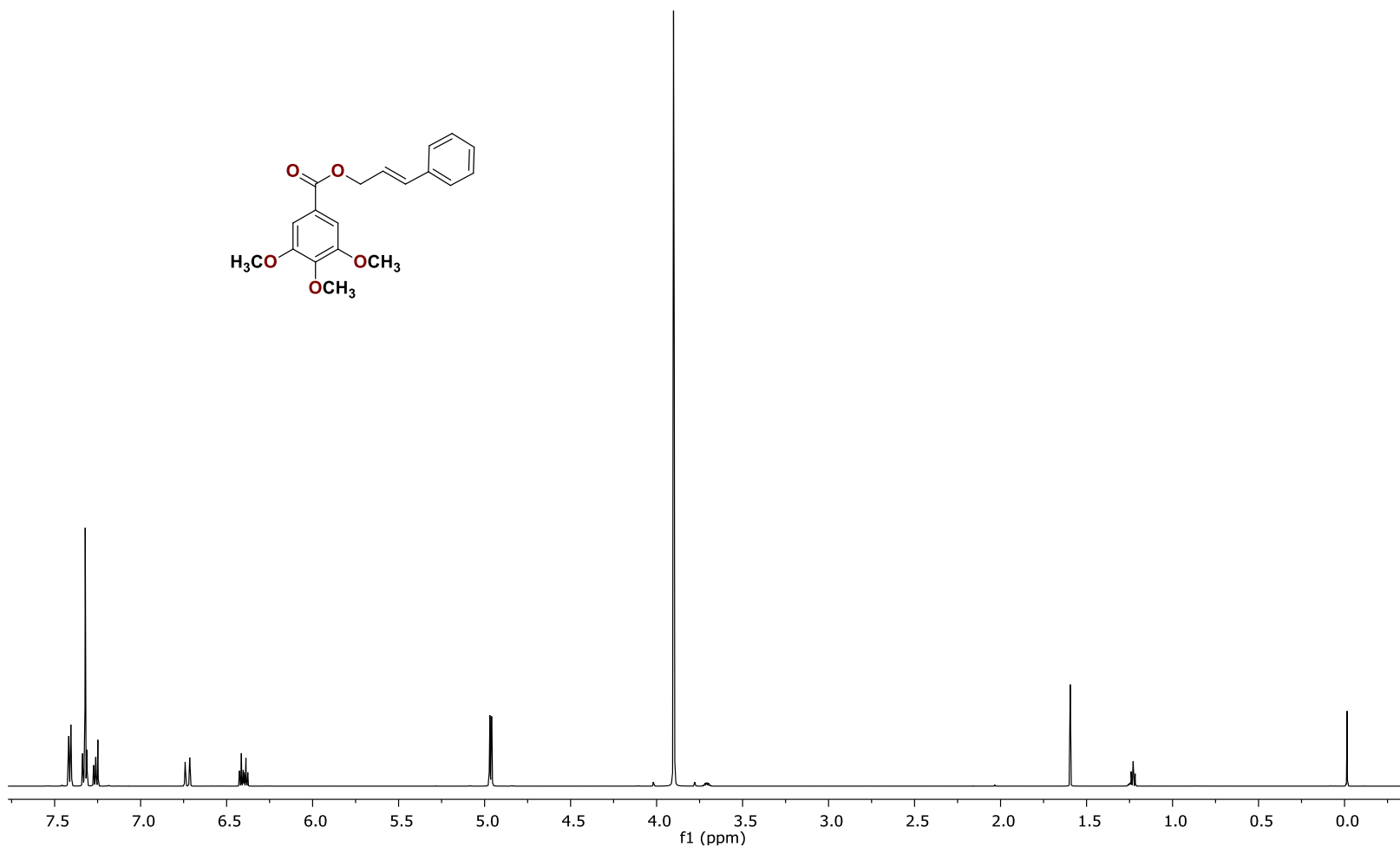
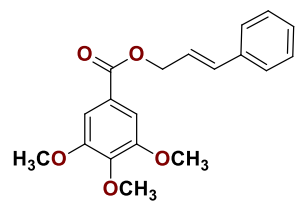
La caracterización de los compuestos se llevó a cabo mediante análisis de RMN de ^1H , ^{13}C y CG/EM con purezas aceptables > 92%.

Los compuestos **N1** a **N9** no se degradan al ser incubados en medio de cultivo celular durante 72 h, tiempo requerido para nuestras evaluaciones biológicas. Lo anterior nos permite asegurar que al incubar las células con nuestros compuestos el efecto observado se deberá a nuestros derivados y no a algún compuesto producto de su degradación en el medio de cultivo.

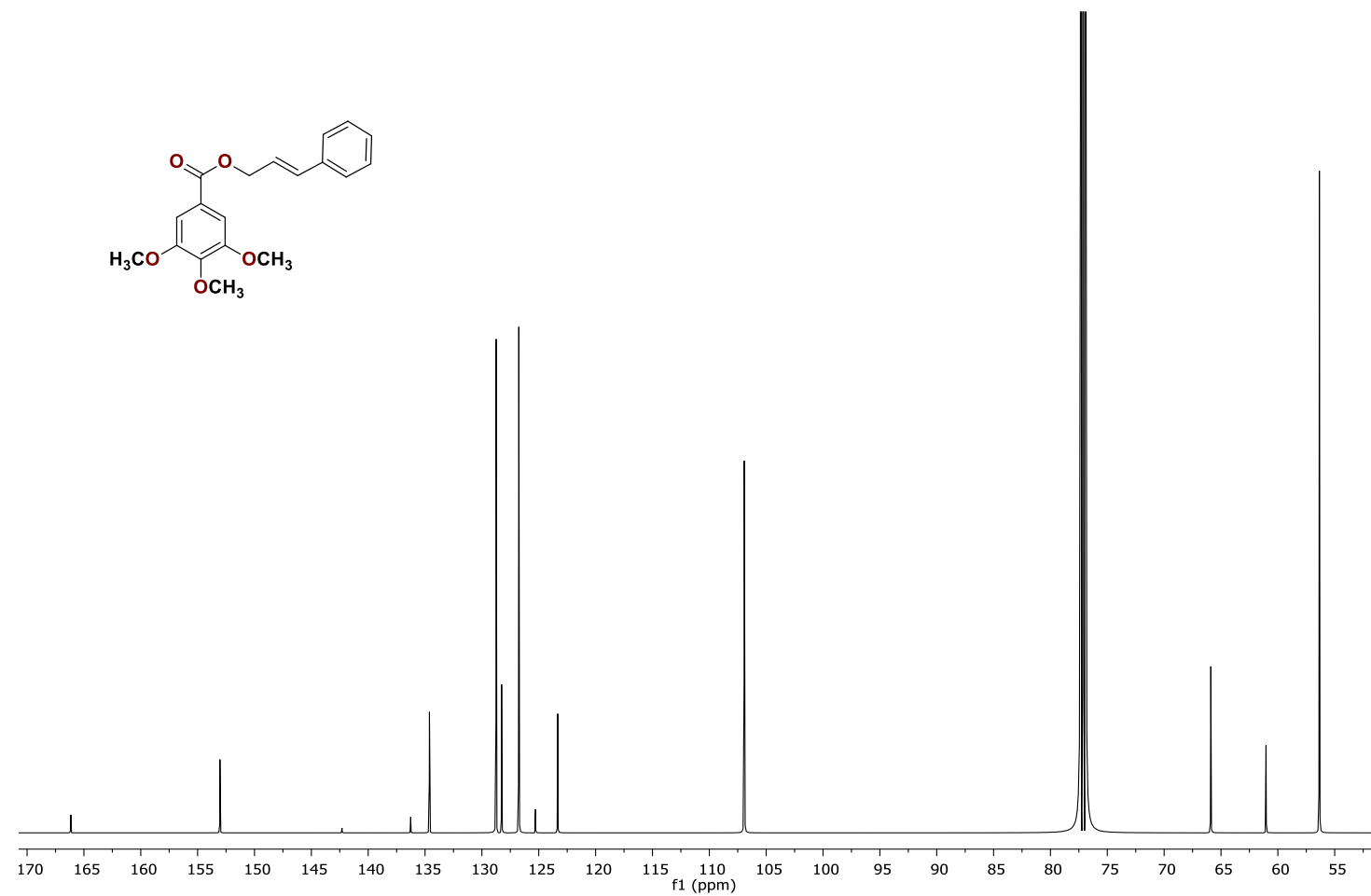
3.4 REFERENCIAS

1. Leyva-Peralta MA, Robles-Zepeda RE, Razo-Hernández RS, Berber LPÁ, Lara KO, Ruiz-Bustos E, et al. Berberine as Source of Antiproliferative Hybrid Compounds: In Vitro Antiproliferative Activity and Quantitative Structure-activity Relationship. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019 Jan 10;19(15):1820–34.
2. Silva RHN, Andrade ACM, Nóbrega DF, Castro RDD, Pessôa HLF, Rani N, et al. Antimicrobial Activity of 4-Chlorocinnamic Acid Derivatives. *Biomed Res Int.* 2019;2019.

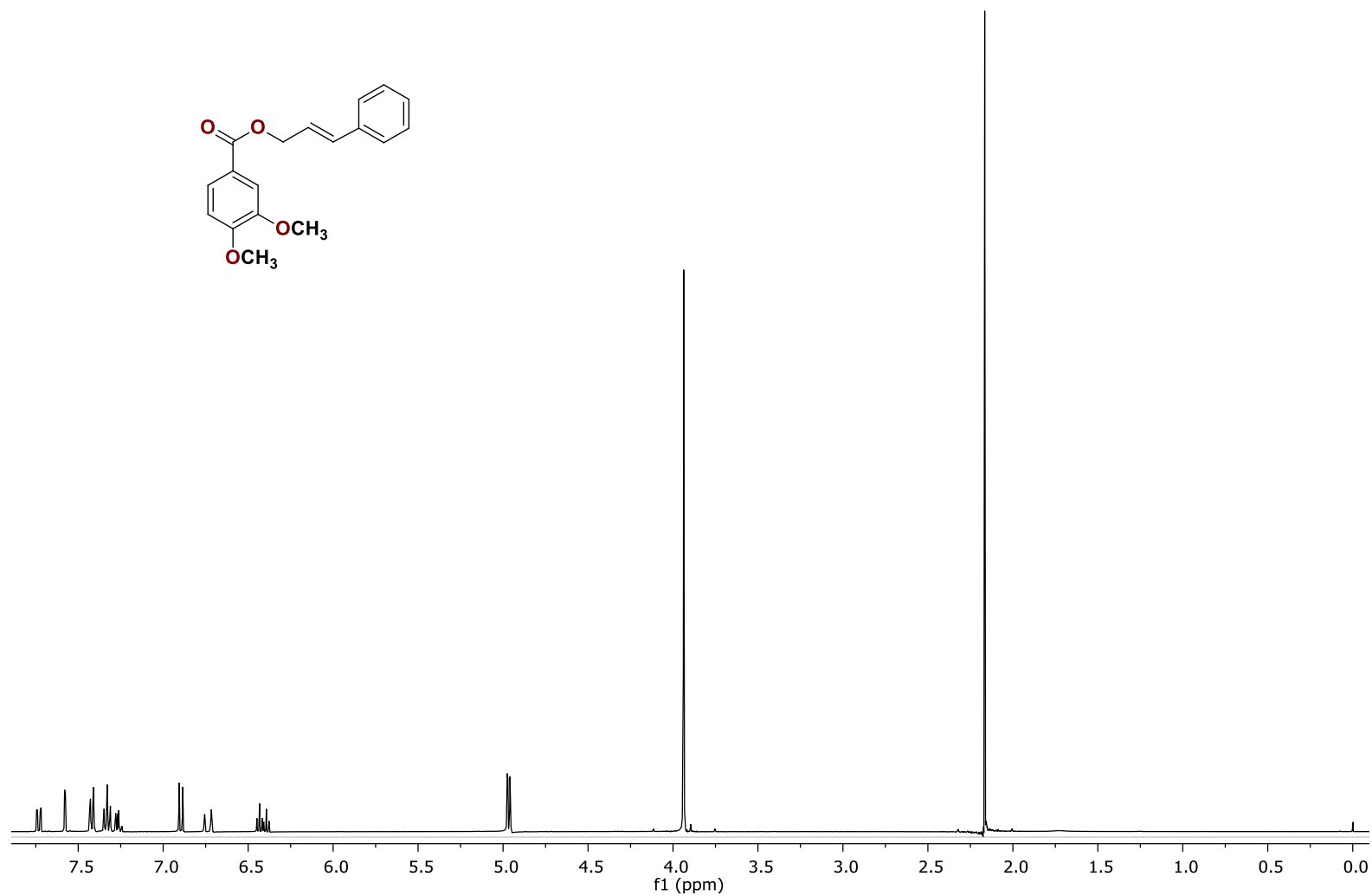
3.5 ANEXOS



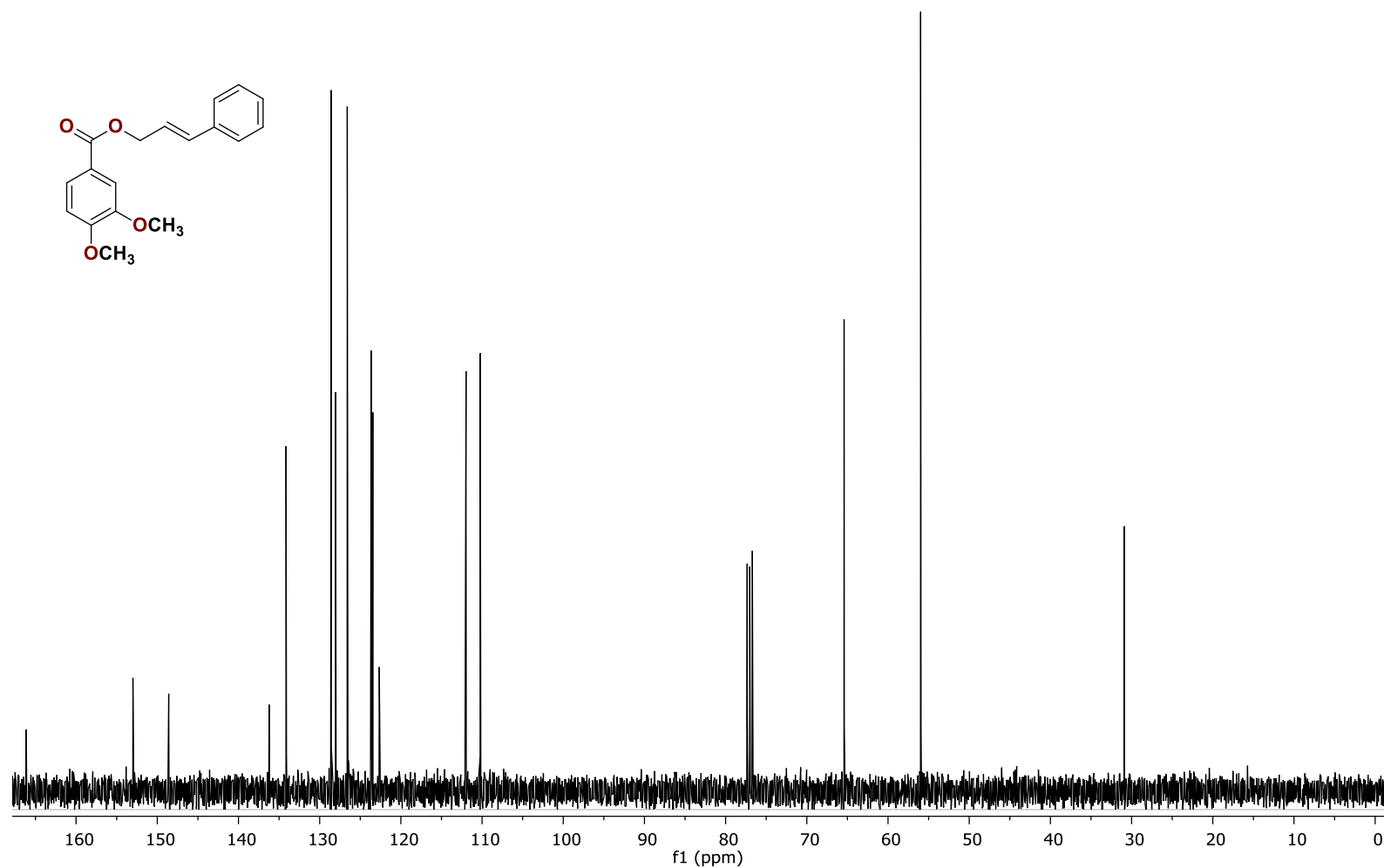
Espectro 1. RMN ^1H (CDCl_3 , 600 (MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de cinamilo (N1)



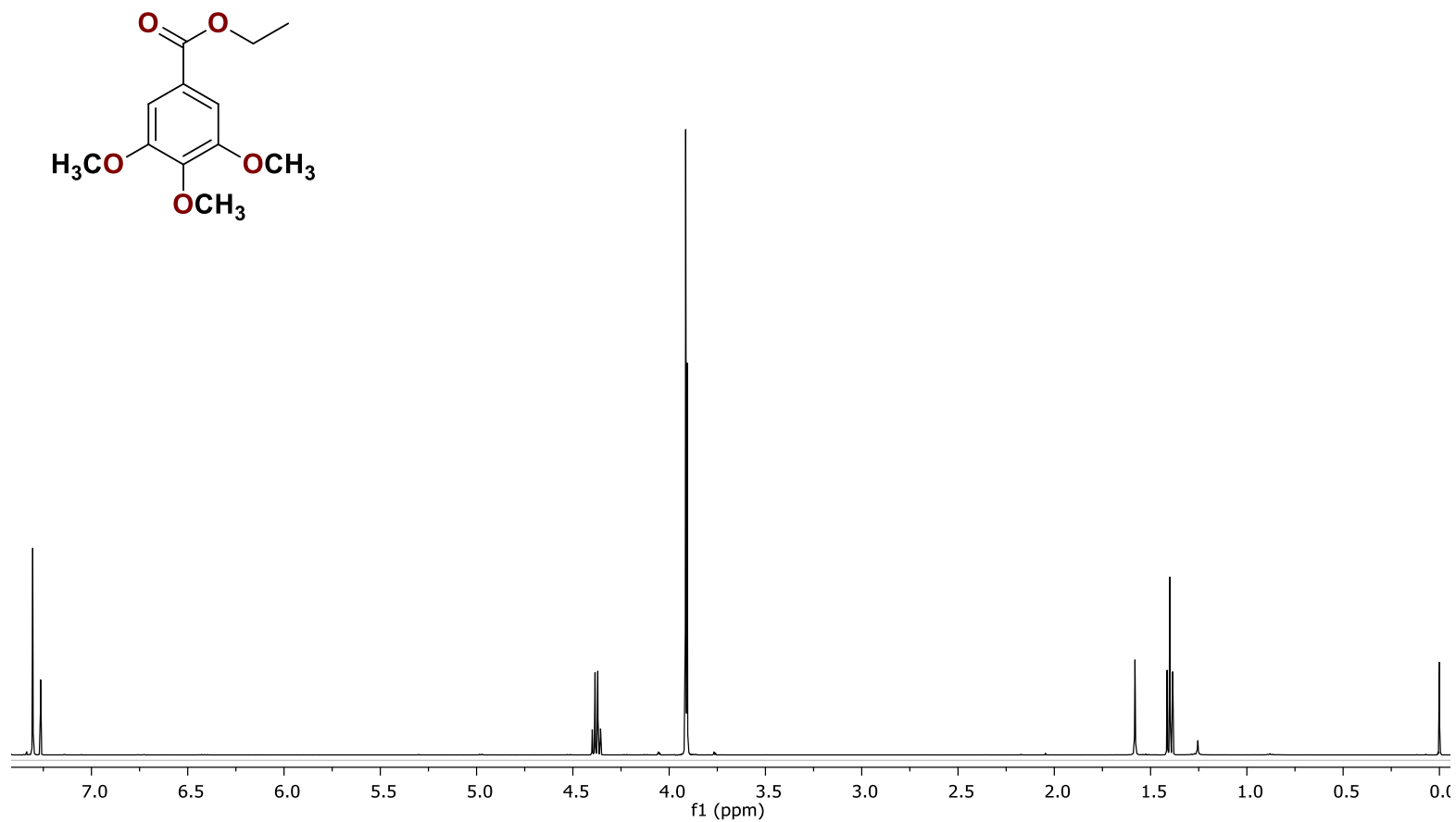
Espectro 2. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 (MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de cinamilo (N1)



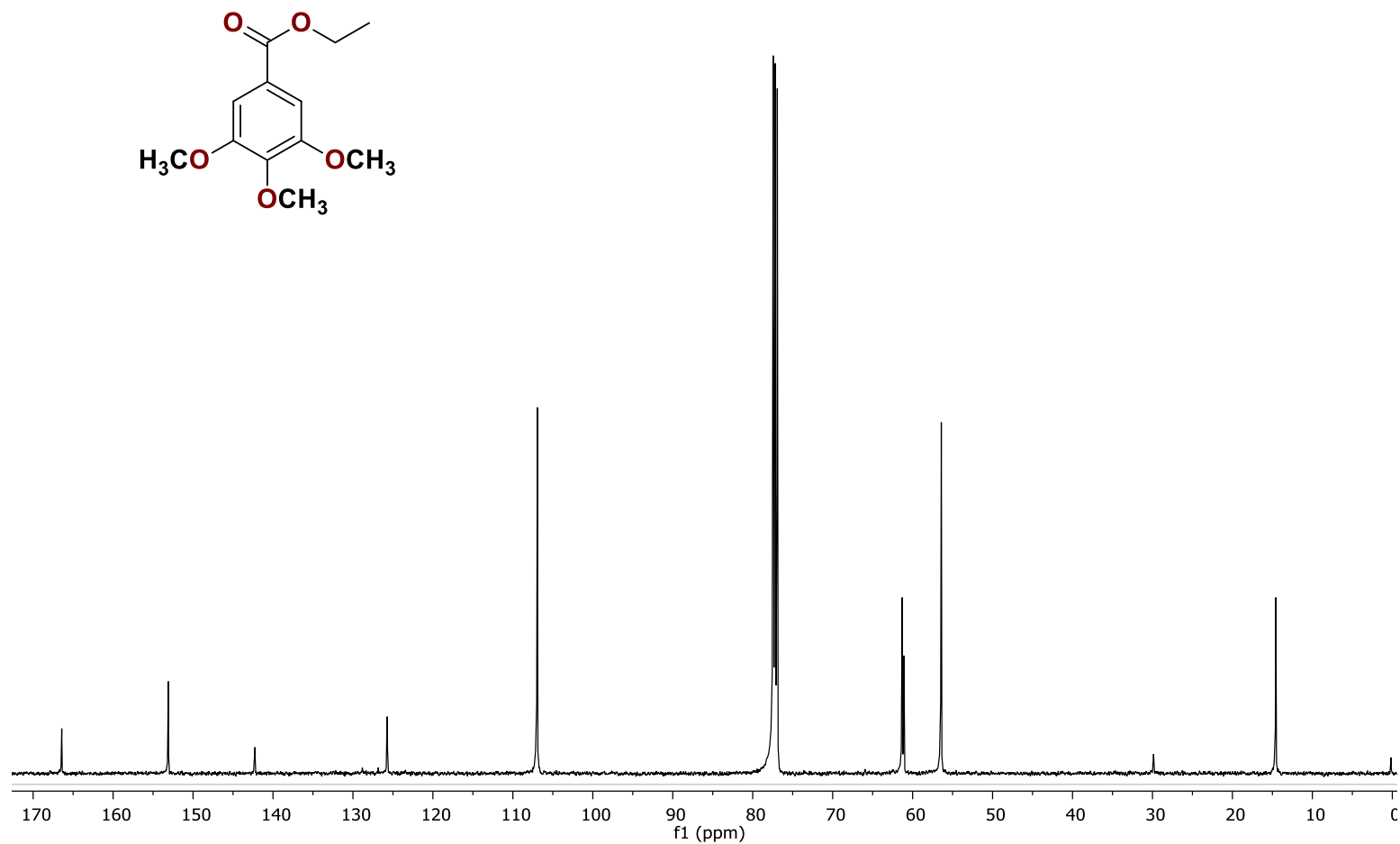
Espectro 3. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de cinamilo (N2)



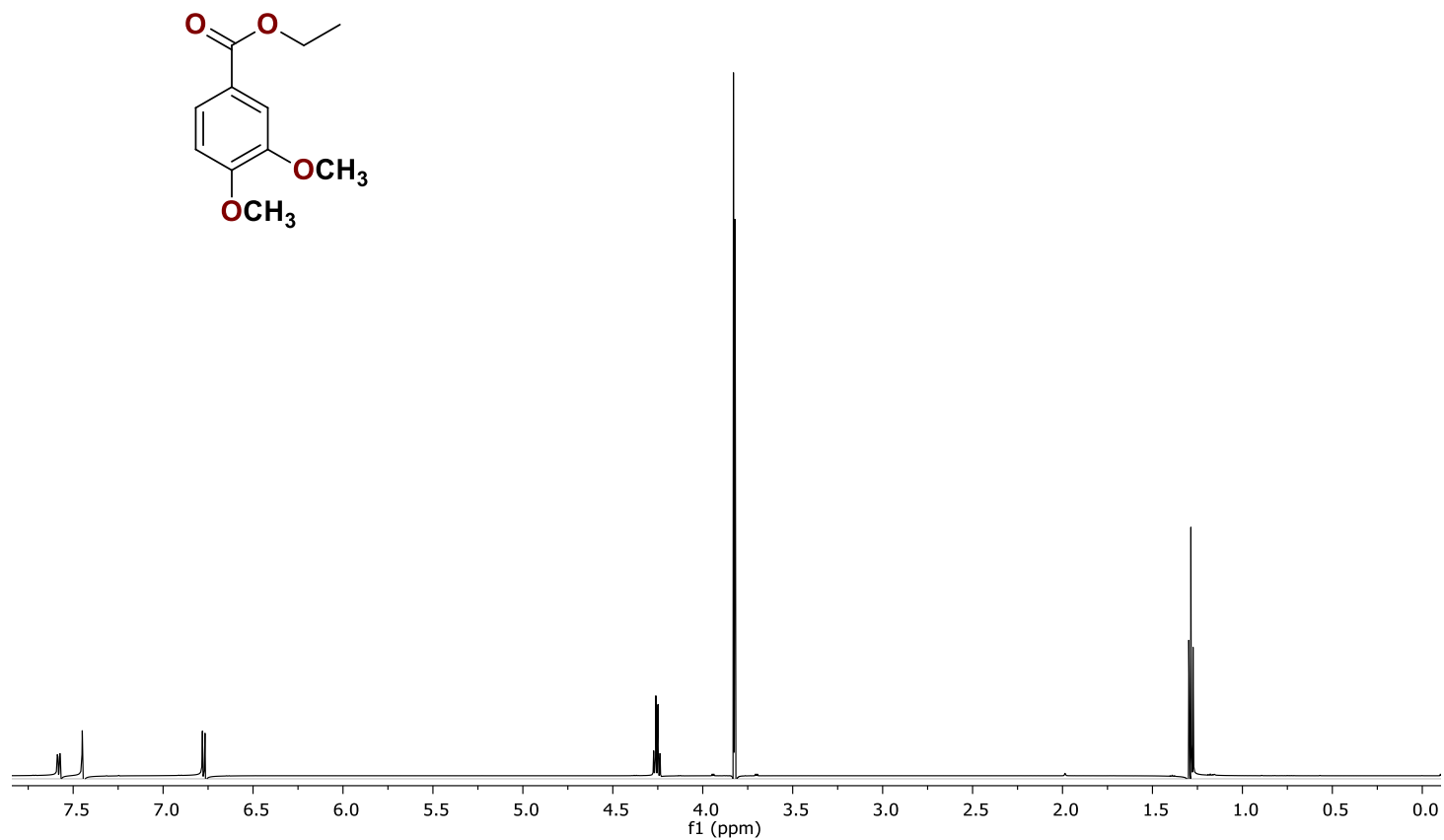
Espectro 4. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de cinamilo (N2)



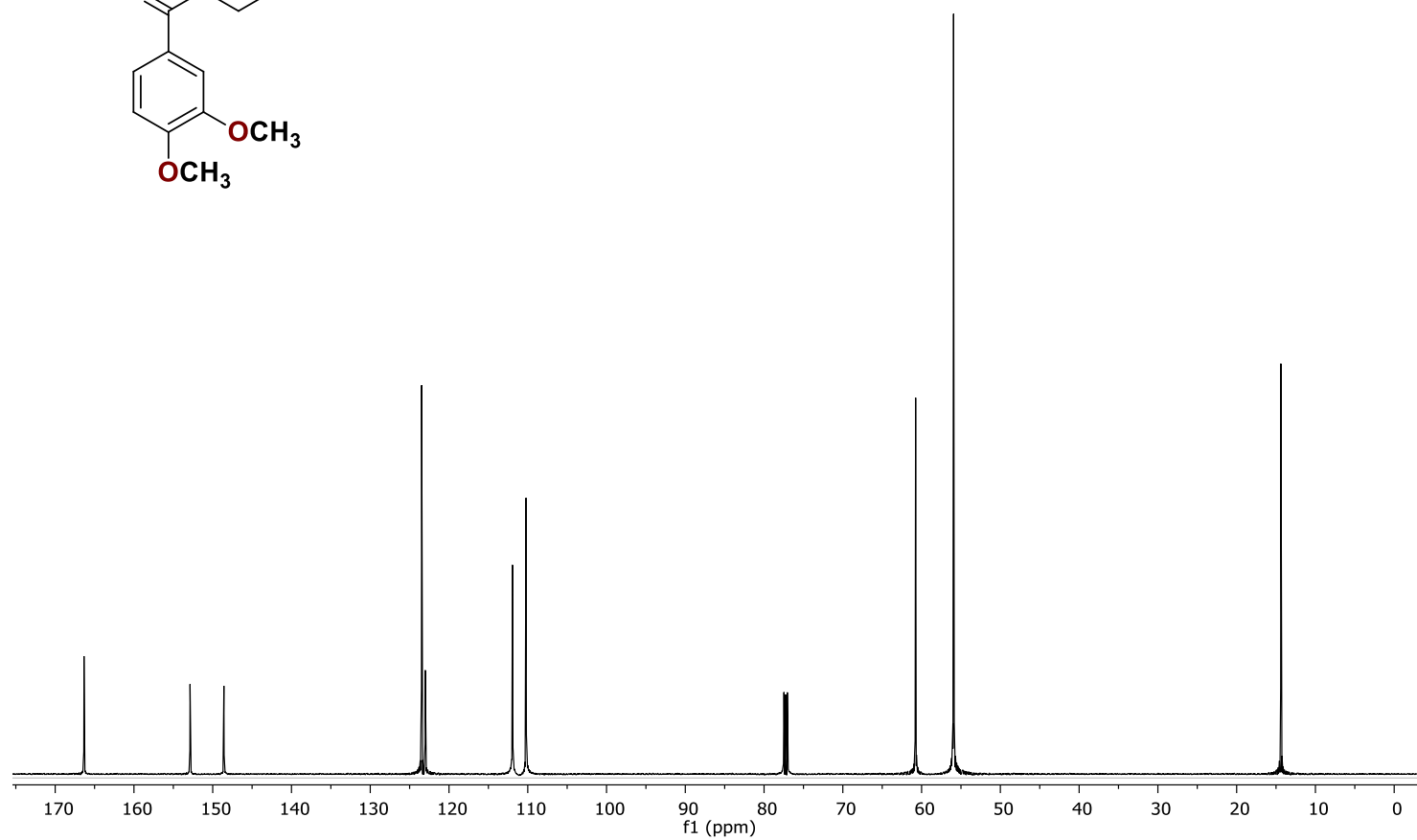
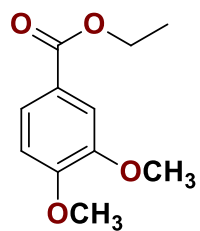
Espectro 5. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etilo (N3)



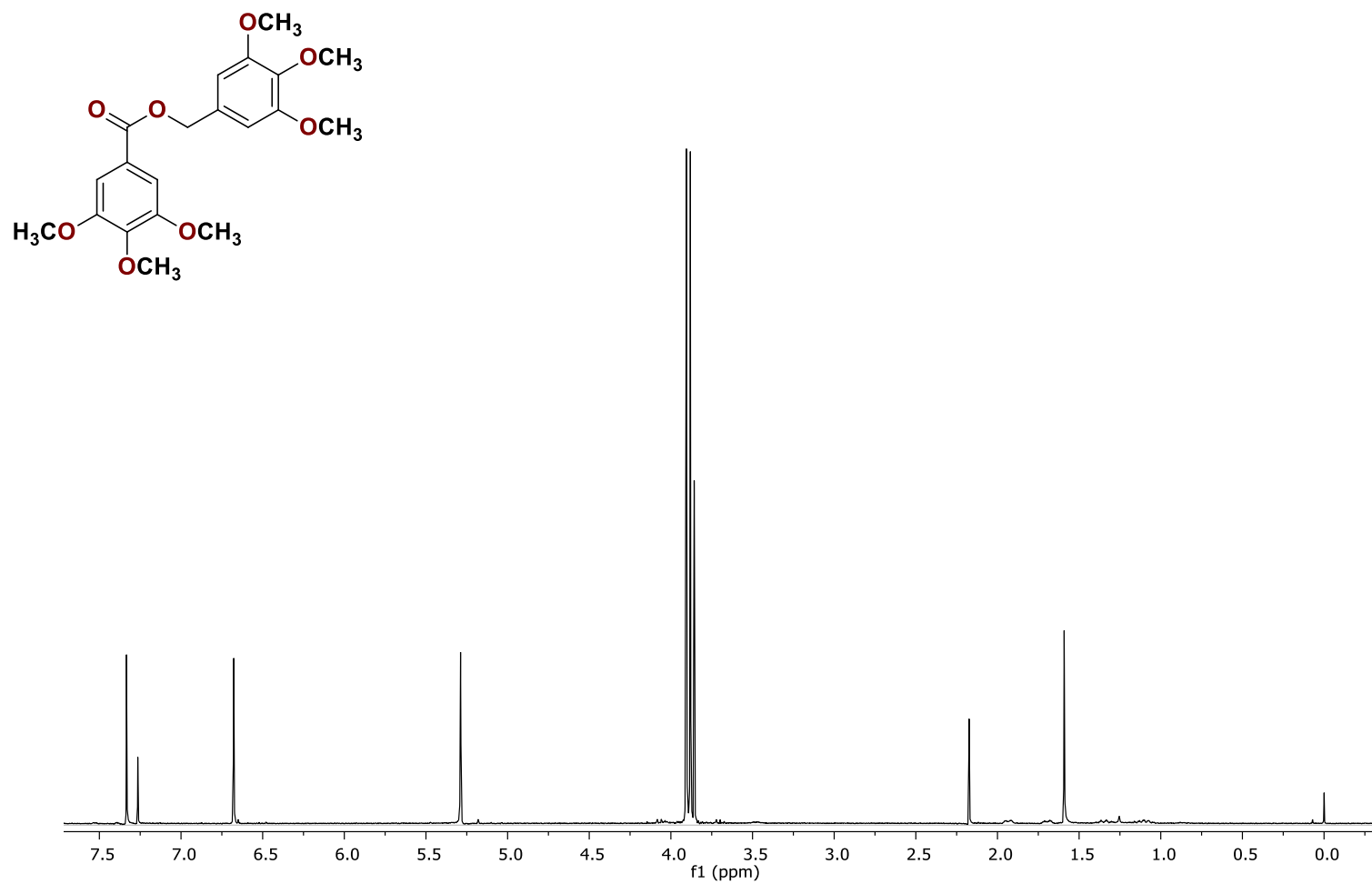
Espectro 6. RMN ¹³C (CDCl₃, 125.77 MHz) de 3,4,5-trimetoxibenzoato de etilo (N3)



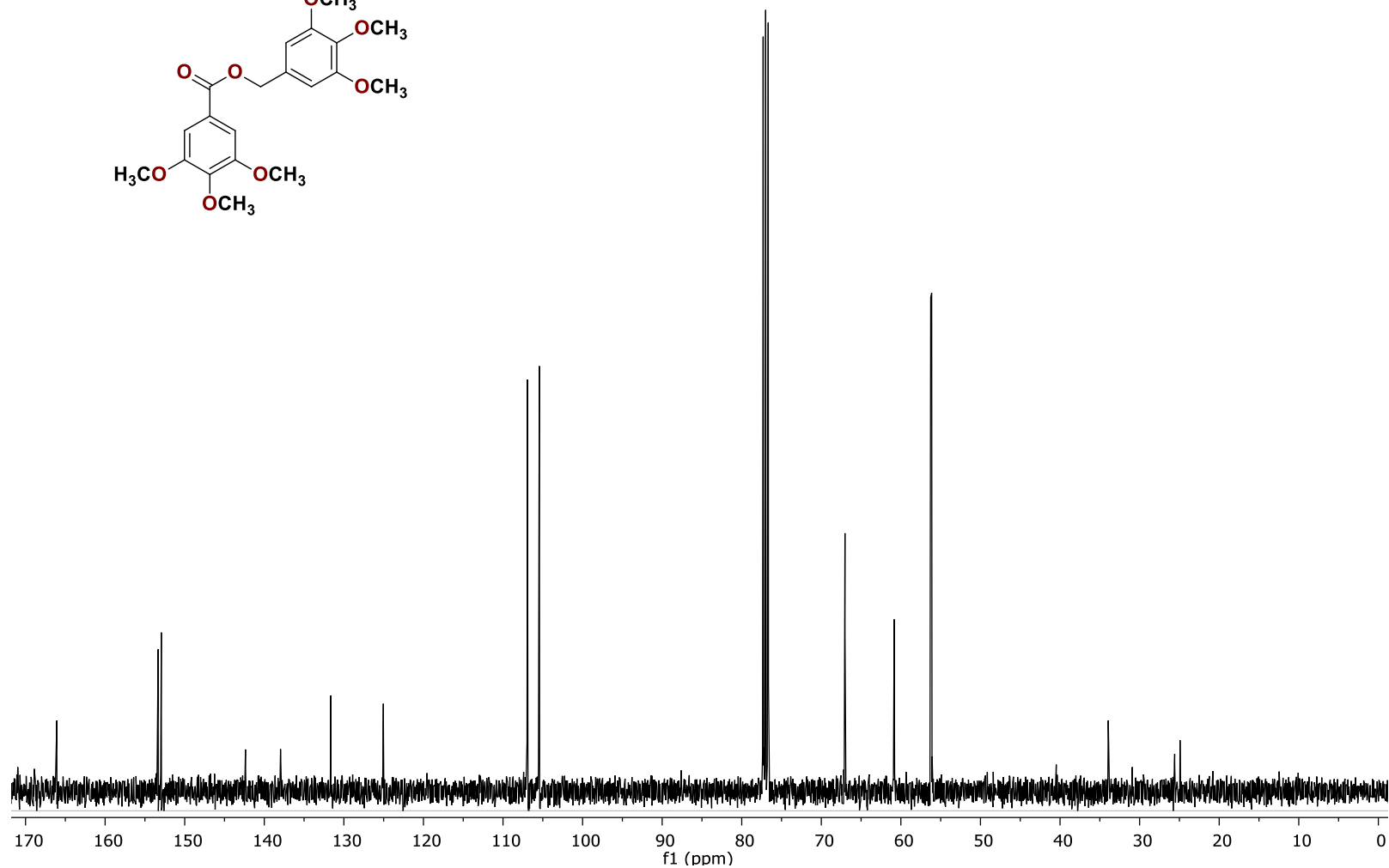
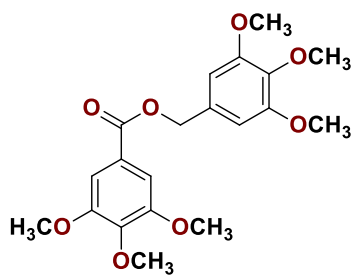
Espectro 7. RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de etilo (N4)



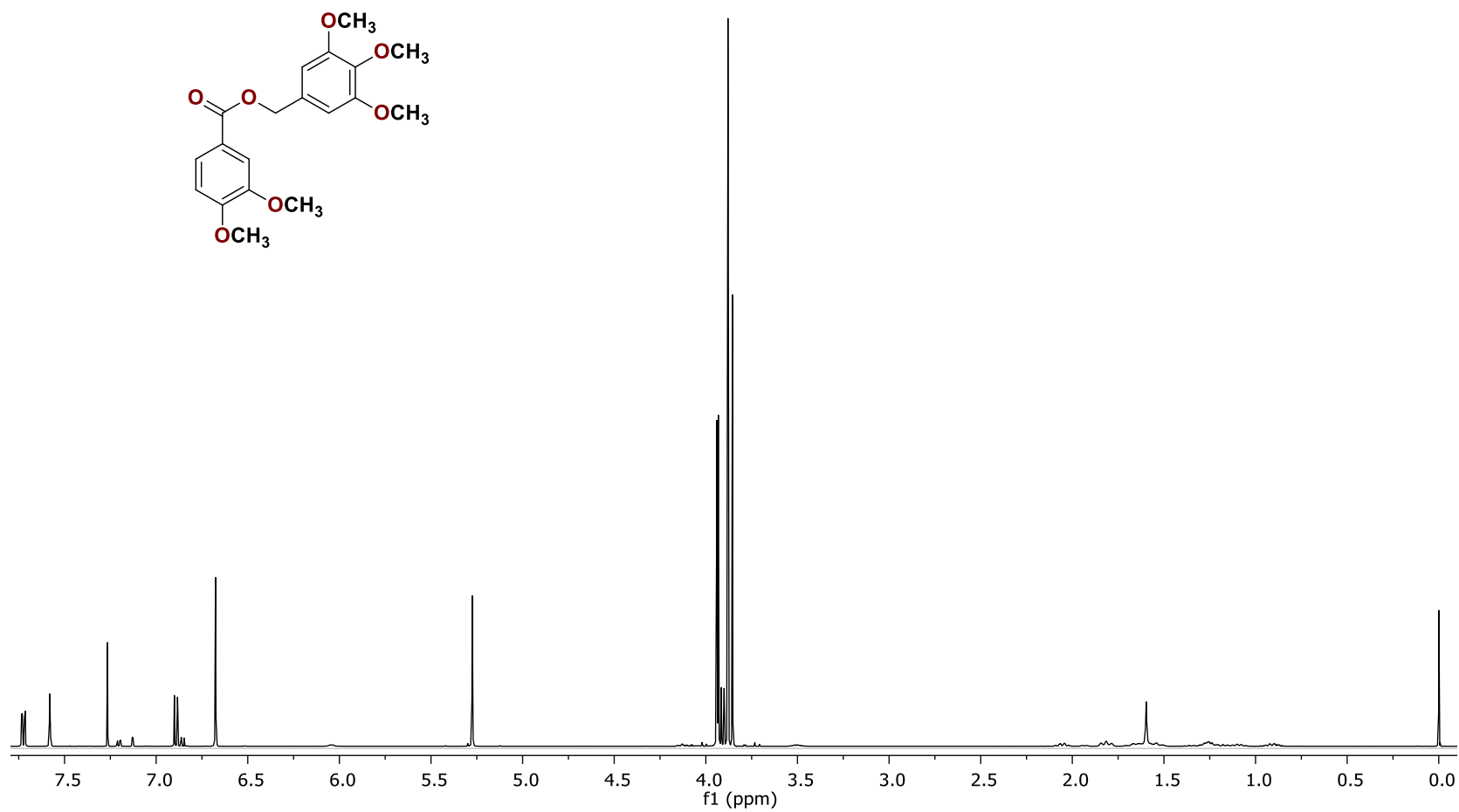
Espectro 8. RMN 13C (CDCl₃, 150 MHz) de 3,4-dimetoxibenzoato de etilo (N4)



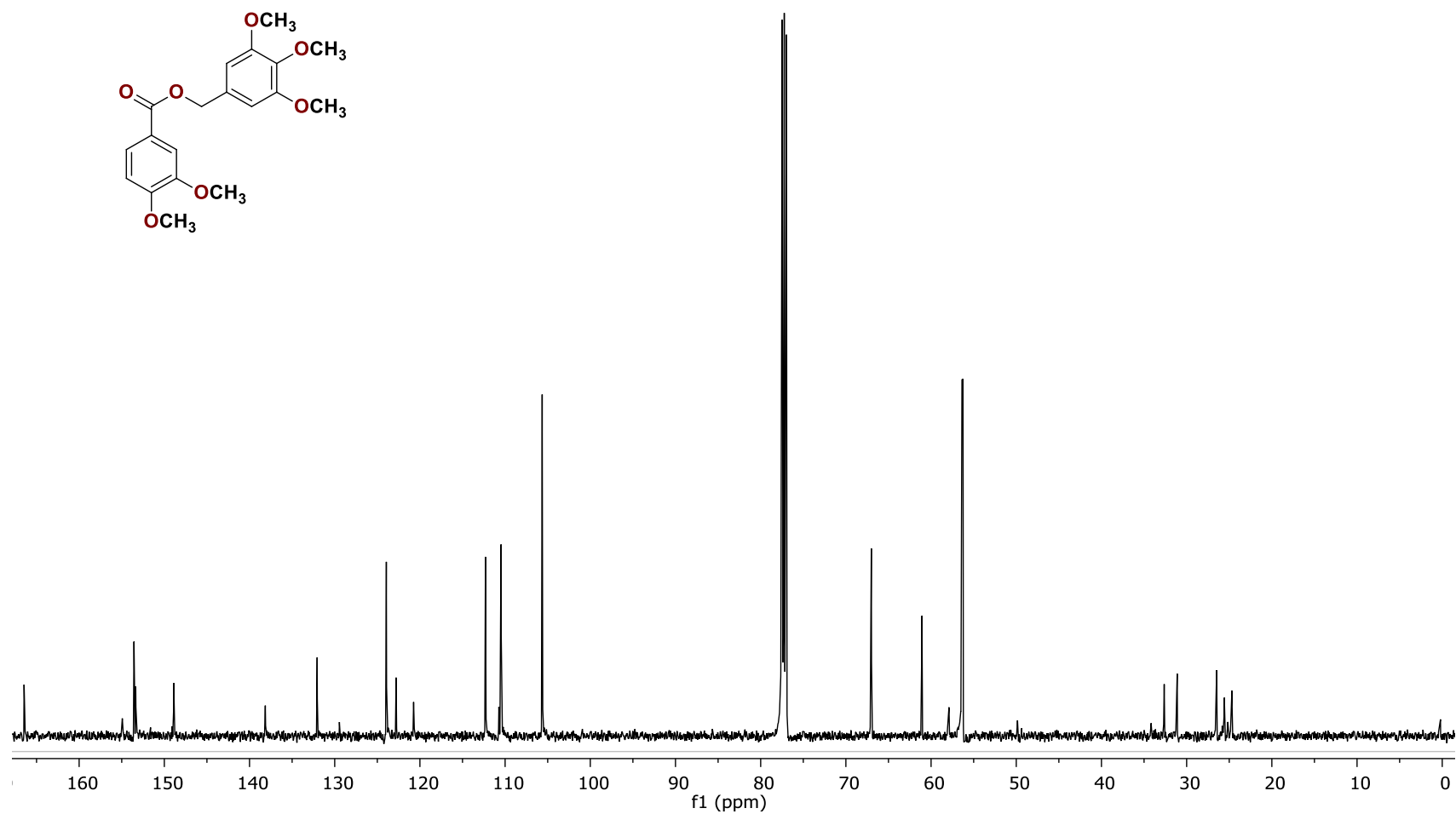
Espectro 9. RMN ^{13}C (CDCl₃, 400 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-trimetoxibenzoato (N5)



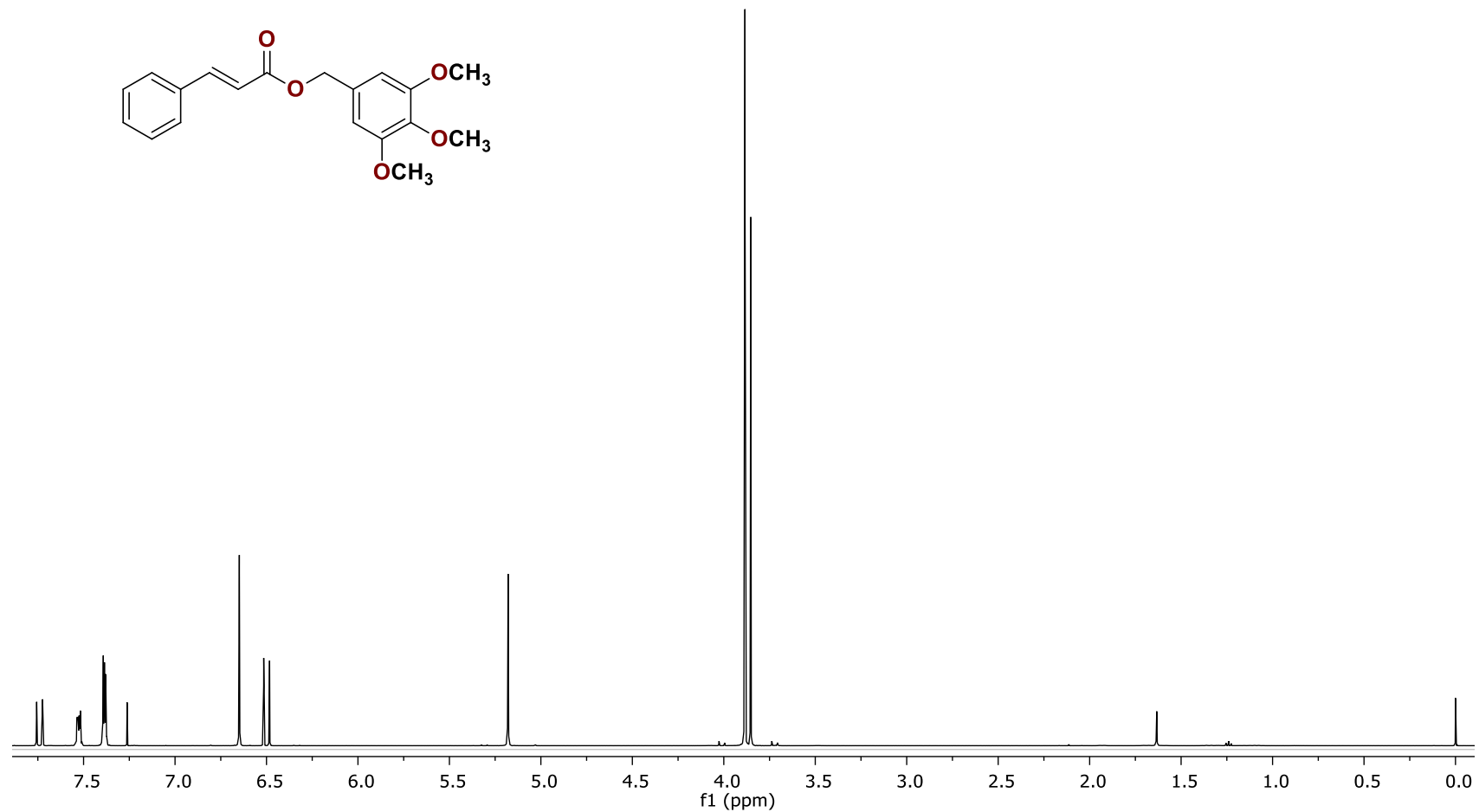
Espectro 10. RMN ^{13}C (CDCl $_3$, 150 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-trimetoxibenzoato (N5)



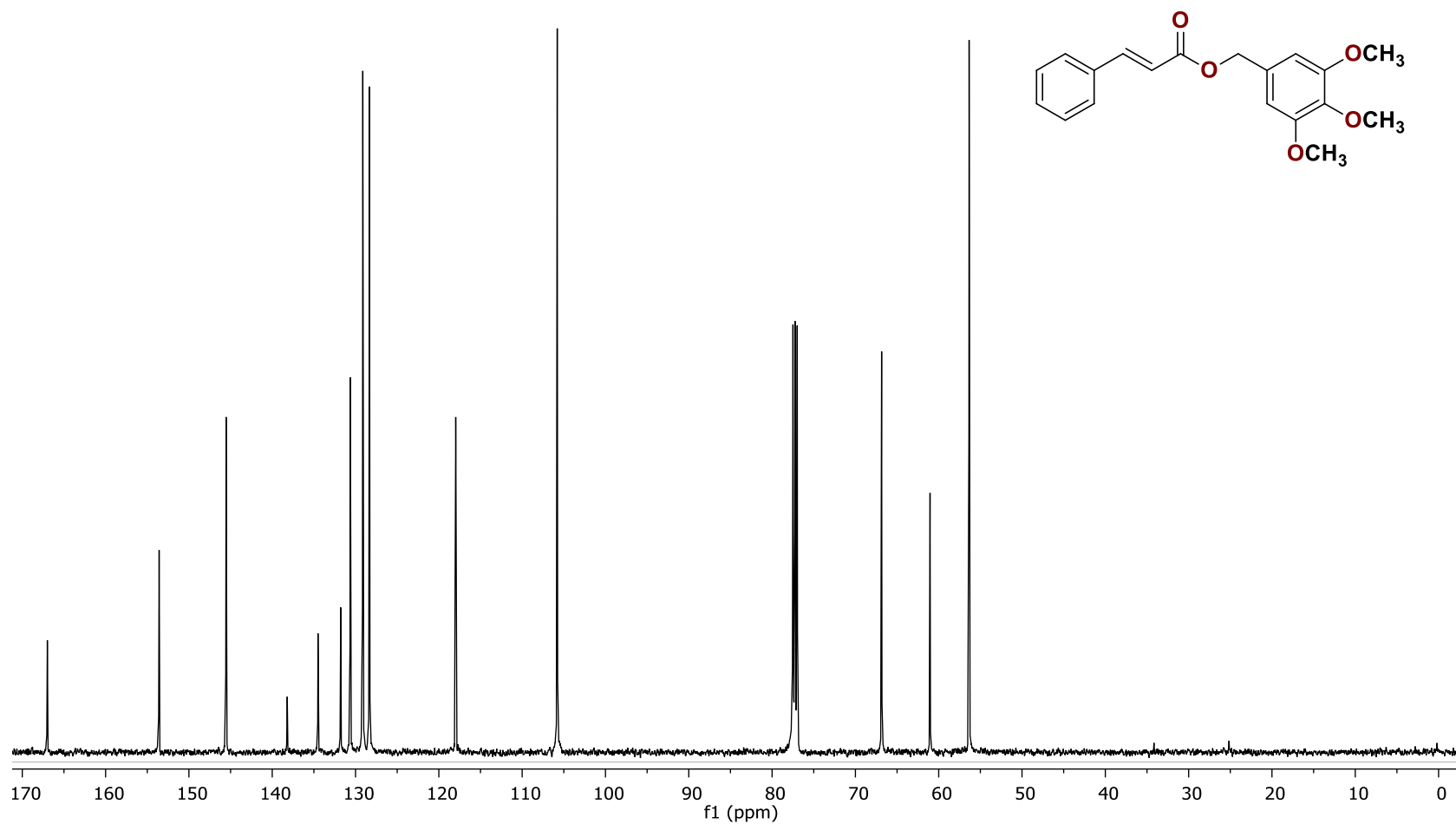
Espectro 11. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4-dimetoxibenzoato (N6).



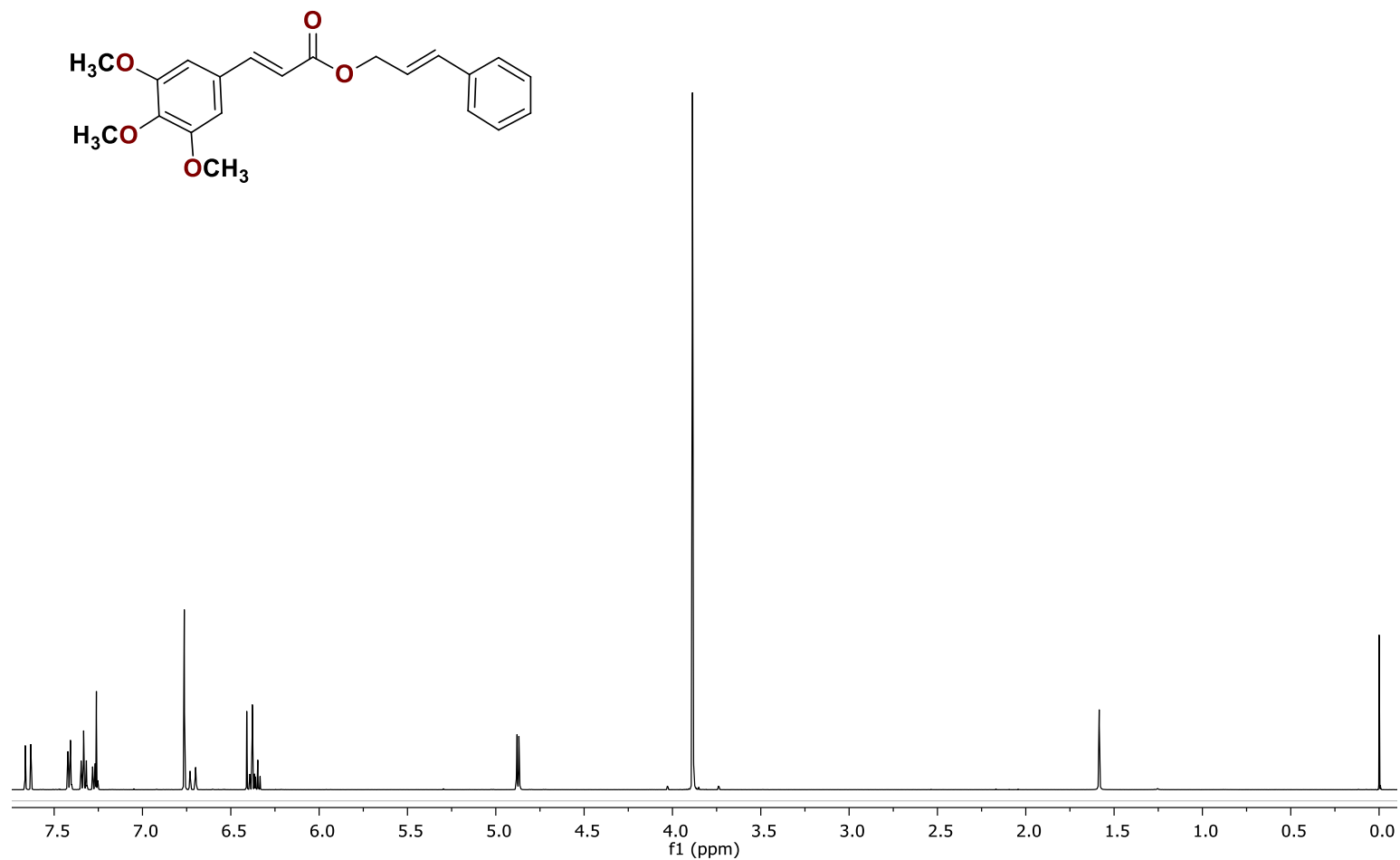
Espectro 12. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125.77 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4-dimetoxibenzoato (N6)



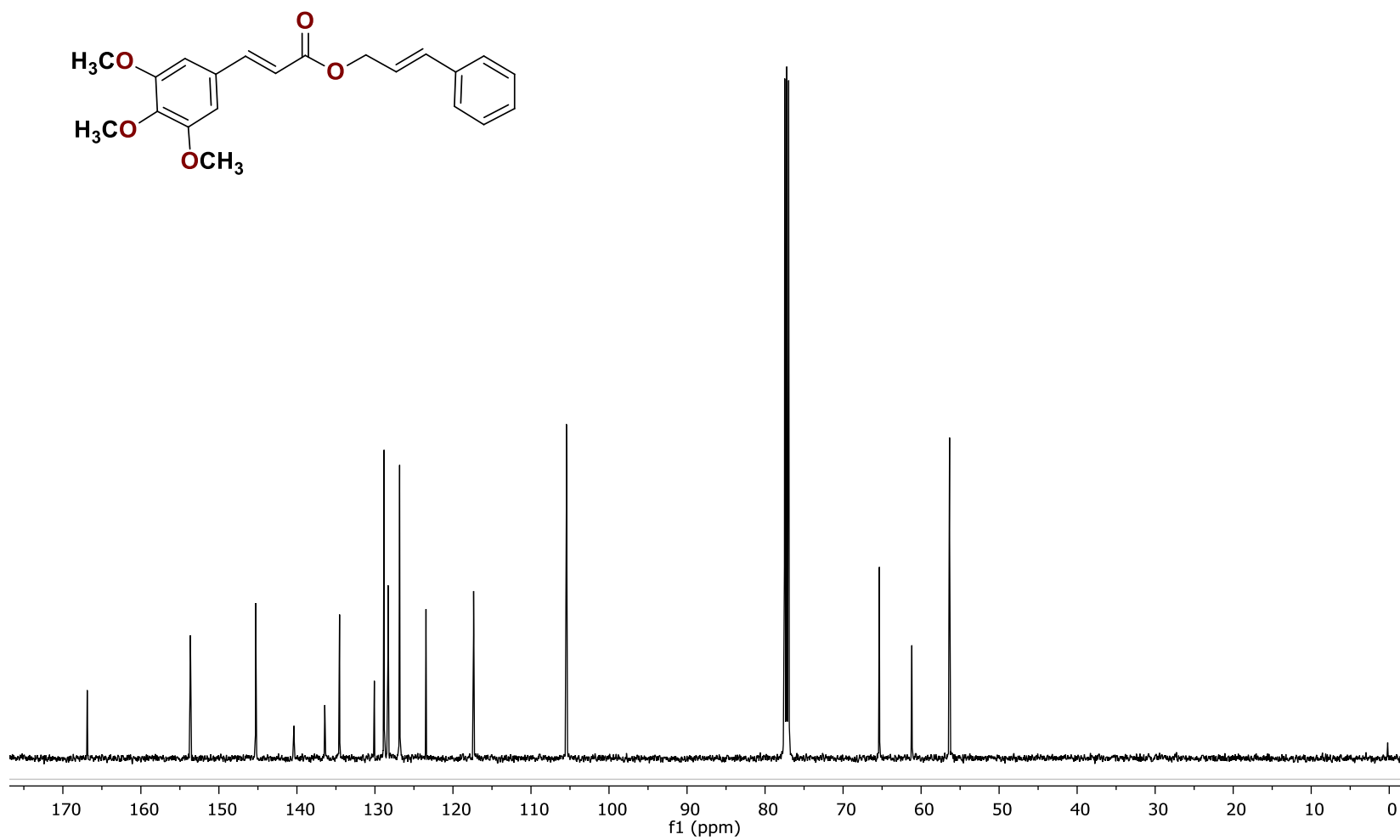
Espectro 13. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil cinamato (N7)



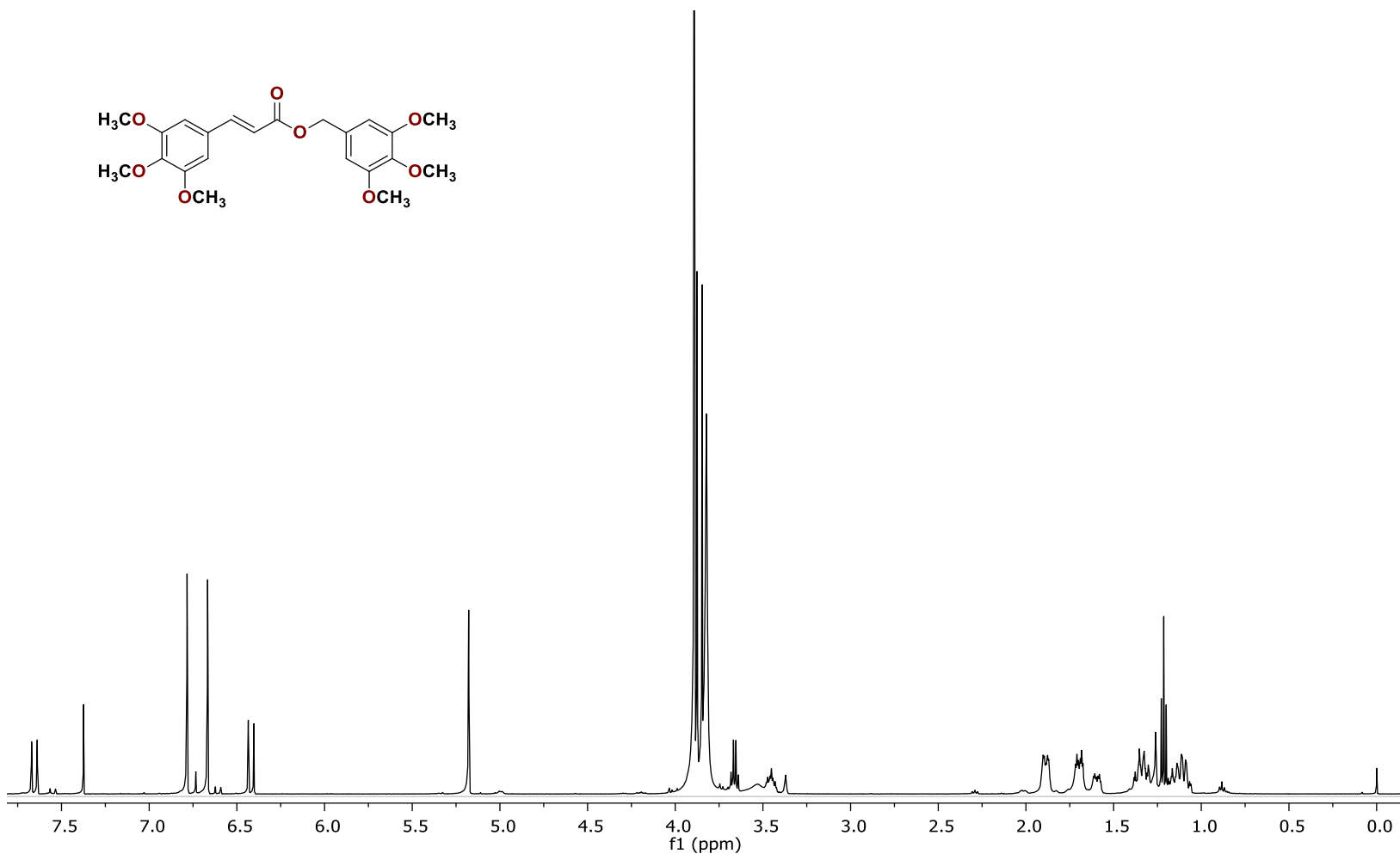
Espectro 14. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125.77 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil cinamato (N7)



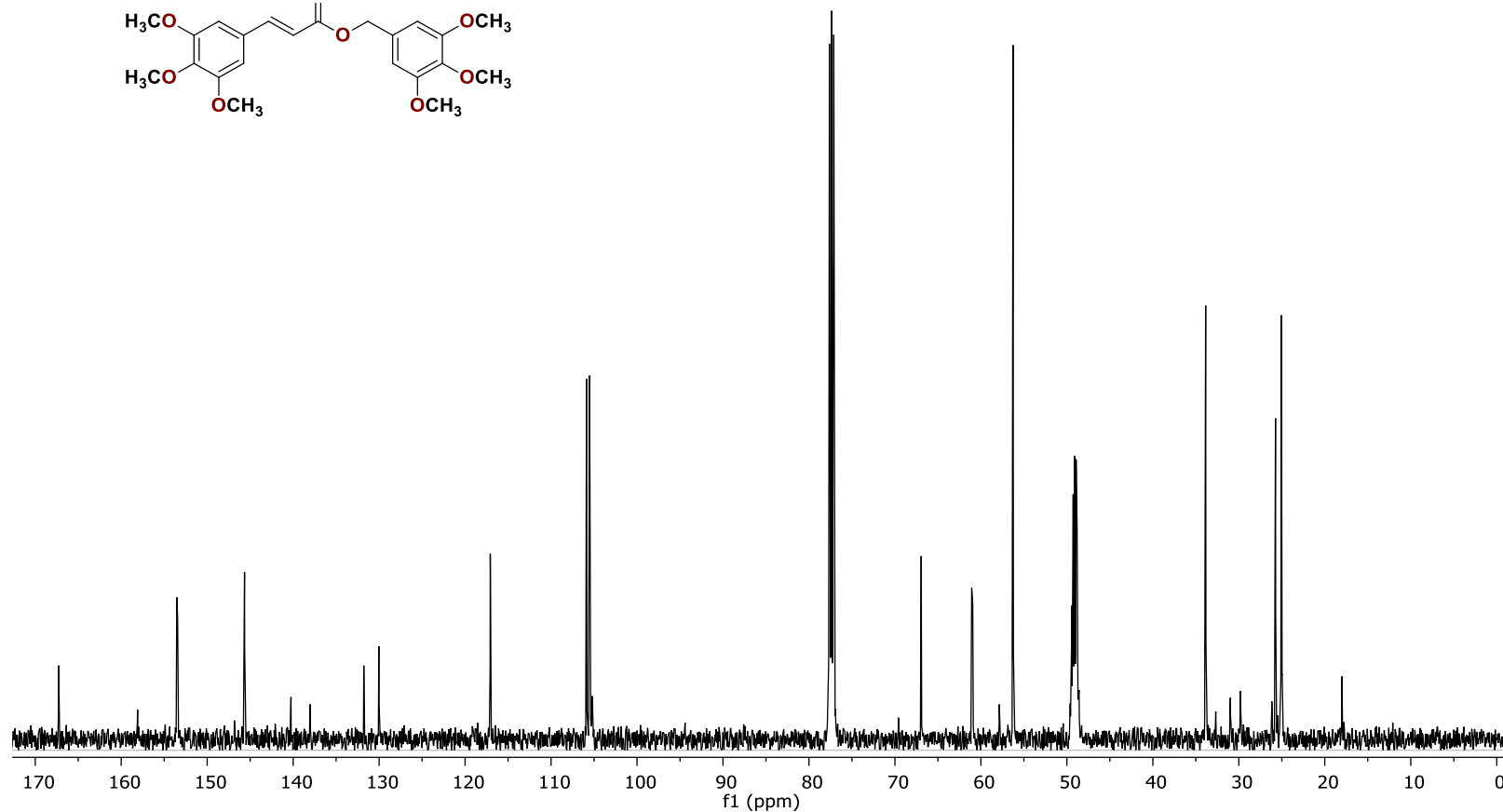
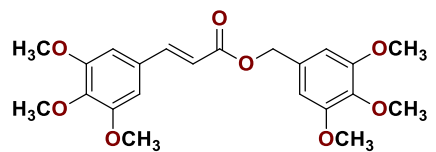
Espectro 15. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de 3,4,5-trimetoxicinamato de cinamilo (N8).



Espectro 16. RMN ^{13}C (CDCl₃, 125.77 MHz) de 3,4,5-trimetoxicinamato de cinamilo (N8).



Espectro 17. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-Trimetoxicinamato (N9)



Espectro 18. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125.77 MHz) de 3,4,5-Trimetoxibencil 3,4,5-Trimetoxicinamato (N9)

CAPÍTULO IV

Actividad citotóxica *in vitro* y análisis *in silico* del mecanismo de acción de los derivados N1-N9

En el presente capítulo se describen las evaluaciones experimentales de los derivados **N1-N9** en dos líneas celulares, lo que permite analizar la relación estructura actividad de nuestros compuestos. Además, también se efectúa un alineamiento estructural que junto con ciertas características de nuestras moléculas nos llevan a proponer un mecanismo de acción que se sustenta a través de acoplamientos moleculares.

4.1 DETALLES EXPERIMENTALES

4.1.1 Cultivo celular

Para este trabajo se utilizaron dos líneas celulares: HeLa (ATCC) y HaCat (Thermo Fisher), correspondientes a una población de cáncer cervicouterino y a una población de queratinocitos humanos inmortalizados, respectivamente. Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM (Invitrogen); mientras que las HaCaT se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (Invitrogen), ambos medios de cultivo se complementaron con un 10% de FBS (Invitrogen) y 2mM de glutamina. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

4.1.2 Ensayo de viabilidad celular

Se utilizó el ensayo MTT para evaluar la actividad de viabilidad celular, para lo cual se cultivaron 4,000 células por pozo en una placa de 96 pocillos, se añadieron diferentes concentraciones de los compuestos (0,1, 1, 10, 50 y 100 µg/mL) seguidas de 72 h de incubación a 37 ° C y 5% de CO₂, se utilizó paclitaxel como control positivo. Al final de los tratamientos, se añadieron 10 µL de bromuro

de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT, 5 mg / mL) y se incubaron durante 4h (37 ° C, 5% CO₂). Posteriormente, los cristales de formazán se disolvieron con 100 µL de la solución de solubilización en cada pozo y la placa se analizó en un lector multiplaca utilizando una longitud de prueba de 570 nm y una longitud de referencia de 690 nm. La actividad citotóxica de los compuestos se reporta como los valores de IC₅₀, que se define como la concentración inhibitoria media, a la cual el compuesto inhibe la proliferación en un 50%.

4.1.3 Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 9.0 y los valores IC₅₀ se determinaron mediante un análisis de regresión. Los resultados se expresan como media ± D.E. de al menos tres experimentos independientes por triplicado.

4.2 DETALLES COMPUTACIONALES

4.2.1 Acoplamiento (*docking*) molecular sobre tubulina

Todos los candidatos finales se prepararon (obtención del conformador mínimo) de la misma manera que las moléculas utilizadas para el estudio QSAR (vide supra). Para estudiar la interacción de estos compuestos con la tubulina empleamos las estructuras cristalinas de los complejos colchicina-tubulina (PDB: 5XIW)¹ y pirimidina heterocíclica-tubulina (PDB: 6BR1).² Estos cristales se seleccionaron en función de sus ligandos co-cristalizados (compuestos estructurales similares y no similares) y de su efecto inductor causado sobre la

tubulina; la forma y el tamaño de los bolsillos de unión a la colchicina se muestran en la figura 4.1S, obtenidos con la herramienta DoGSiteScorer³ del servidor ProteinsPlus (<https://proteins.plus>).^{4,5} El cristal de 5XIW tiene un volumen, una superficie y una profundidad del bolsillo de unión a la colchicina de 715.26 Å³, 813.68 Å² y 16.04 Å, respectivamente. Para el cristal 6BR1, su volumen, superficie y profundidad del bolsillo de unión a la colchicina tienen los siguientes valores 546.43 Å³, 619.33 Å² y 4.83 Å, respectivamente. Comparando los valores de volumen, superficie y profundidad de la cavidad, se puede observar que hay grandes diferencias entre estas dos bolsas de unión. Por lo tanto, se logrará un análisis de acoplamiento más completo de nuestros compuestos, ya que estamos considerando diferentes parámetros estructurales de la cavidad de unión a la tubulina. Para cada cristal, se realizó un acoplamiento molecular dirigido al sitio de unión de la tubulina en el sitio de unión de la colchicina. La figura 4.1 muestra el sitio de unión utilizado para los cálculos de acoplamiento en cada complejo cristalino, y las interacciones moleculares implicadas en la unión del inhibidor. Todos los cálculos del acoplamiento se realizaron con AutoDock Vina.⁶ Se utilizó el esquema de cargas parciales AM1, con una caja cúbica de 10 Å. Para asegurar la confianza de nuestros resultados de docking, se reprodujo la conformación de cada inhibidor cocrystalizado con un valor de desviación cuadrática media (**RMSD** del inglés *Root-Mean-Square Deviation*) de 0.2 Å y 0.8 Å para 5XIW y 6BR1, respectivamente (figura 4.2S y 4.3S, anexo del capítulo IV).

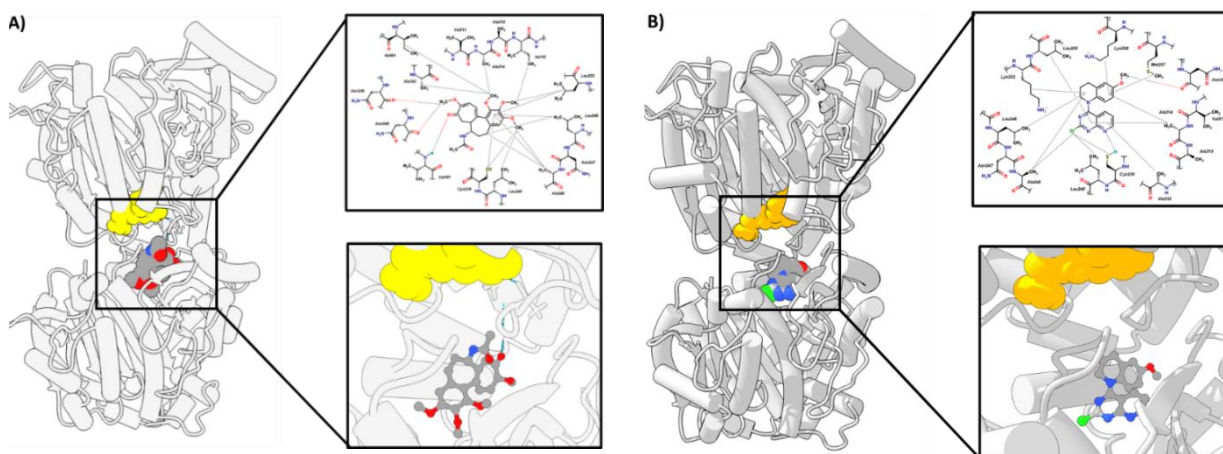


Figura 4.1. Estructura cristalina del complejo colchicina-tubulina (PDB:5XIW) y del complejo heterocíclico pirimidina-tubulina (PDB:6BR1). A) Interacciones moleculares entre la colchicina y la tubulina. B) Interacciones moleculares entre la pirimidina heterocíclica y la tubulina.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 EVALUACIÓN BIOLÓGICA Y SAR

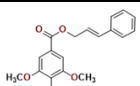
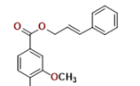
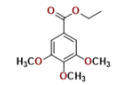
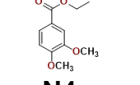
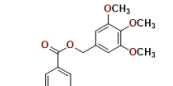
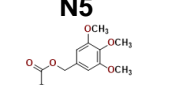
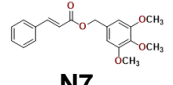
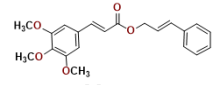
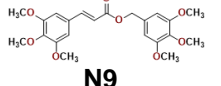
Los análogos de galato de arilo sintetizados (**N1-N9**) se evaluaron mediante el ensayo MTT in vitro para comprobar su capacidad de alterar la viabilidad celular de la línea celular de cáncer humano de cuello uterino HeLa. Los resultados se resumen en la tabla 4.1, e indican que los derivados 3,4,5-trimetoxibenzoato de cinamilo (**N1**), 3,4,5-trimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**N5**) 3,4-dimetoxibenzoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**N6**), y 3,4,5-trimetoxicinamato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**N9**) fueron los más potentes con valores de $IC_{50ExpHeLa}$ de 11.29 ± 1.70 , 9.45 ± 2.46 , 7.26 ± 0.68 y 11.95 ± 3.22 μM , respectivamente. Los derivados **N4** ($IC_{50ExpHeLa} = 68.70 \pm 19.24$ μM), **N7** ($IC_{50ExpHeLa} = 35.13 \pm 9.55$ μM) y **N8** ($IC_{50ExpHeLa} = 43.48 \pm 9.78$ μM) mostraron un efecto muy bajo, mientras que los

derivados **N2** y **N3** presentaron $IC_{50ExpHeLa}$ superiores a 100 μM . Es importante destacar que el efecto citotóxico de los compuestos **N1**, **N5**, **N6** y **N9** también se evaluó en la línea HaCaT ($IC_{50ExpHaCaT}$), y no se observó ningún efecto significativo en estas células no cancerosas.

En la tabla 4.1, se puede observar que los compuestos más activos tienen un sistema diarílico unido a través de una cadena de carbono que incluye oxígeno; muchos de los cuales conservaron el motivo del trimetoxi galato. Este resultado coincide con los informes que sugieren que este motivo favorece el efecto citotóxico de varios compuestos que interactúan principalmente con la tubulina.^{7,8} Algunos productos naturales de este tipo, caracterizados por inhibir la polimerización de la tubulina (figura 4.2A-2D), son la colchicina, la podofilotoxina, la esteganacina y la Combretastatina A4 (CA-4).⁹⁻¹¹

Es importante mencionar que diversos estudios de relación estructura-actividad han demostrado que los compuestos inhibidores del sitio de unión de la colchicina (CBSI) del tipo CA-4 están constituidos por un sistema diarílico (Anillos A y B) unidos a través de un doble enlace. El anillo A está trimetoxilado, y el anillo B con varias sustituciones.^{7,10,12,13}

Tabla 4.1 Valores correspondientes a las actividades citotóxicas experimentales y la predichas de los derivados N1-N9.

Molécula	IC ₅₀ PredHeLa	IC ₅₀ ExpHeLa	IC ₅₀ ExpHaCaT
 <p>N1</p>	6.41	11.29 ± 1.70	>100
 <p>N2</p>	5.93	>100	ND
 <p>N3</p>	12.89	>100	ND
 <p>N4</p>	12.23	68.70 ± 19.24	ND
 <p>N5</p>	10.19	9.45 ± 2.46	>100
 <p>N6</p>	12.13	7.26 ± 0.68	>100
 <p>N7</p>	25.61	35.13 ± 9.55	ND
 <p>N8</p>	19.31	43.48 ± 9.78	ND
 <p>N9</p>	28.99	11.95 ± 3.22	>100

Mientras que otras moléculas que se sabe que interactúan con la tubulina en el sitio de la colchicina son ((2E)-1-(3', 4', 5'-trimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona)¹⁴ (figura 4.2E) y 1-metil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-(4-etoxifenil)-1H-pirazol¹⁵ (figura 4.2F) con alta similitud estructural a nuestros compuestos. Estudios experimentales sobre estas moléculas, demostraron que inhiben la polimerización de la tubulina, y se sugiere que se unen en el sitio de la colchicina (basado en el acoplamiento molecular).

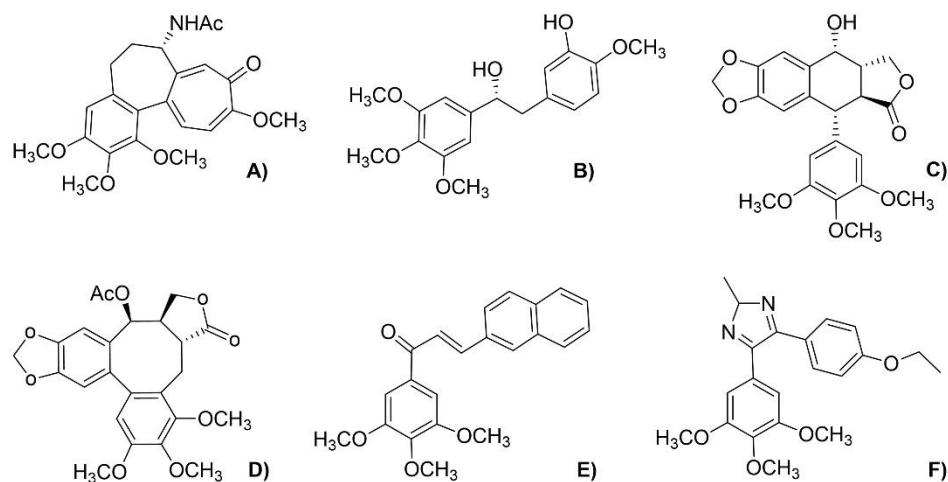


Figura 4.2. Representaciones en 2D de moléculas que interactúan con la tubulina y que presentan en su estructura el grupo trimetoxi fenilo. A) Colchicina, B) Combretastatina C) Podofilotoxina y D) Esteganacina E) ((2E)-1-(3', 4', 5'-trimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona) y F) 1-metil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-(4-etoxifenil)-1H-pirazol.

En la figura 4.3 se muestra la alineación estructural de estos compuestos con nuestros candidatos. Los paneles A y B muestran la alineación estructural entre la (I) colchicina respecto con (II) pirazol y con el análogo de la (III) chalcona, respectivamente, mientras que el panel C muestra la alineación entre II y III. Estos

resultados muestran que el fragmento estructural 3,4,5-trimetoxifenilo está presente en este tipo de inhibidores, y su importancia en el modo de unión de estos compuestos con la tubulina. **I** y **II** son la conformación biológicamente activa extraída de su complejo cristalino: 5XIW y 5Z4U, respectivamente. Es importante mencionar que **III** ((2E)-1-(3',4',5'-trimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona)¹⁴ está estructuralmente relacionada con nuestros compuestos, especialmente con **N1**, lo que la convierte en nuestra referencia estructural para comparar nuestros compuestos. Por lo tanto, para apoyar nuestra hipótesis de que nuestros candidatos funcionan como inhibidores de la polimerización de la tubulina, se realizó un alineamiento estructural de **N1** (figura 4.3IV), **N5** (figura 4.3V) y **N6** (figura 4.3VI) con respecto al análogo de la chalcona (figura 4.3D, 4.3E y 4.3F); podemos observar que el solapamiento de las estructuras es mejor en el orden de **N1**<**N5**<**N6**, lo que también ocurre con su valor de $IC_{50ExpHeLa}$ que disminuye en el mismo orden **N6**<**N5**<**N1**, haciendo que **N6** sea el candidato más potente (menor valor de $IC_{50ExpHeLa}$). A partir de esto podemos proponer que la mayor similitud de nuestros compuestos (**N1**, **N5** y **N6**) con el análogo de la chalcona, mostrarán un mejor efecto citotóxico in vitro, que podría estar asociado a la unión a la tubulina en el sitio de la colchicina.

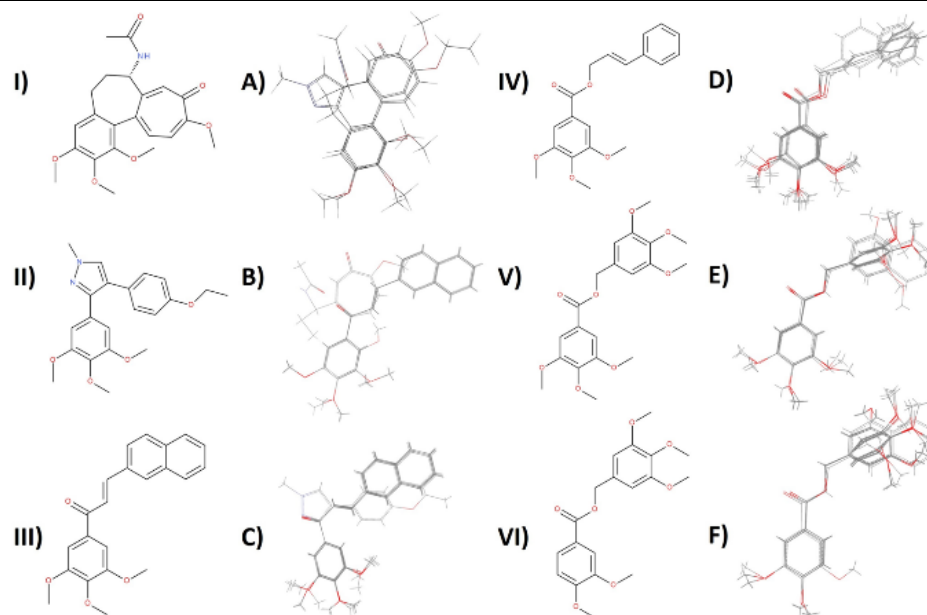


Figura 4.3. Alineamiento estructural de N1, N5 y N6 con compuestos que se unen a la tubulina en el sitio de la colchicina. Representación en 2D de la (I) colchicina, el (II) análogo de pirazol (1-metil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-(4etoxifenil)-1H-pirazol), el (III) análogo de chalcona ((2E)-1-(3',4',5'-trimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona), (IV)N1, (V)N5 y (VI)N6, Alineación estructural de la colchicina respecto al análogo de (A) pirazol y a la (B) chalcona; (C) comparación estructural entre estos dos últimos análogos y alineación estructural entre (D) N1, (E) N5 y (F) N6 respecto con el análogo de chalcona.

Al comparar los IC_{50} predichos respecto a los experimentales, se identificó que la molécula con mejor actividad es **N6**, con un $IC_{50ExpHeLa}=7.26 \pm 0.68$, destacando que **N6** es la molécula con mayor similitud a CA-4. También se determinó que cuanto más considerables son las modificaciones de la cadena que conecta los anillos aromáticos, las sustituciones en estas estructuras y la presencia de un único anillo de 6 miembros, más dispersa es la predicción del efecto citotóxico. Por lo tanto, este modelo puede ayudar a predecir la actividad citotóxica en la línea celular HeLa de algunos derivados del CA-4 de tipo éster con cadenas de enlace de 3 a 5 átomos entre el sistema diarílico. Teniendo en cuenta la literatura de las moléculas analizadas en nuestra generación QSAR, varios

artículos han demostrado experimentalmente que estas moléculas podrían actuar como inhibidores de la topoisomerasa II, intercaladores del ADN, y sobre todo inhibidores de la polimerización de la tubulina, debido a su interacción con el sitio de la colchicina. Proponemos esto último como posible mecanismo de acción de los compuestos **N1**, **N5**, **N6**, **N7** y **N8**. Por lo tanto, fue necesario realizar un acoplamiento molecular sobre la tubulina para evaluar esta hipótesis mediante un enfoque computacional.

4.3.2 Acoplamiento Molecular sobre tubulina

Debido a la similitud molecular de los compuestos con los inhibidores del tipo de la colchicina, el sitio de unión se estableció en la misma región donde se unen estos compuestos, utilizando la estructura cristalina de la tubulina 5XIW (figura 4.1aS). Nuestros resultados muestran que la mayoría de los compuestos se unen de la misma manera que la colchicina, enterrando su anillo trimetoxilado en la cavidad lipofílica de la β -tubulina interactuando con Val313, Ala314, Ala315, Ile316, Cys239, Leu240, Ala248, Leu248 y Leu 253 y manteniendo el otro anillo en la región de interacción de los monómeros α - β (figura 4.4). Algunos de los compuestos dirigen su segundo anillo al cofactor GTP (figura 4.4a), como **N5**, **N6** y **N9**. En cambio, **N1**, **N7** y **N8** no dirigen su segundo anillo al GTP, sino que queda expuesto al disolvente (figura 4.4b). A excepción de **N2**, que se une de una forma totalmente diferente, su segundo anillo está insertado en el bolsillo de unión a la colchicina (figura 4.4b), esto puede estar relacionado con su falta de actividad. En el caso de **N3** y **N4**, su modo de unión es como el de todos los compuestos,

excluyendo a **N2**, insertando el anillo trimetoxilado en el bolsillo de unión de la colchicina (figura 4.4c). Cabe mencionar que las moléculas con un éster aromático forman un enlace de hidrógeno (HB del inglés *Hydrogen Bonding*) en el bolsillo de unión de la colchicina (**N1-N6**) con este grupo funcional y Asn256. Los valores de energía de interacción de la pose más estable (valor energético más negativo) para cada compuesto, obtenidos a partir del cálculo de *docking*, se muestran en la tabla 4.2. A partir de estos resultados, puede observarse que los valores de E_{inter} sólo pueden explicar parcialmente la actividad citotóxica de estos compuestos, como en el caso de **N3** y **N4**, que muestran el mayor valor de E_{inter} (menos favorecido), y **N1**, **N5**, **N6** y **N9** el menor de E_{inter} (más favorecido).

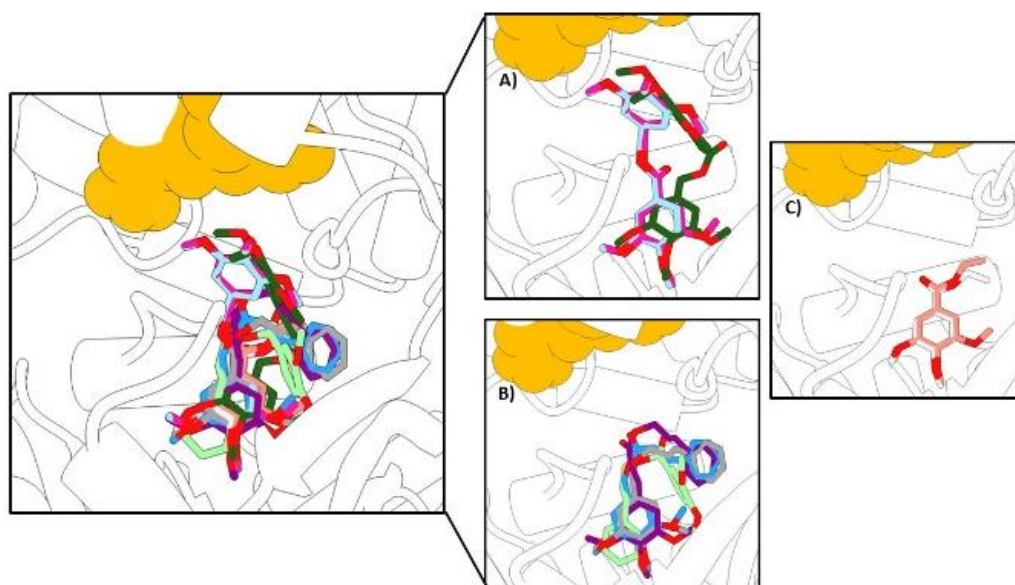


Figura 4.4. Modo de unión de N1-N9 con la tubulina (PDB:5XIW). A) Modo de unión de N5, N6 y N9 con la tubulina. B) Modo de unión de N1, N2, N7 y N8 con la tubulina. C) Modo de unión de N3 y N4 con la tubulina. Todos los ligandos se muestran en representación de palos, los átomos de oxígeno están coloreados en rojo, y los átomos de carbono están coloreados según cada compuesto: **N1 (gris), **N2** (limón), **N3** (naranja), **N4** (blanco), **N5** (rosa), **N6** (cian), **N7** (azul), **N8** (morado) y **N9** (verde).**

La información obtenida hasta ese momento nos llevó a analizar más detenidamente el $\Delta MLOGP$ de cada compuesto. De acuerdo con nuestro modelo QSAR, este descriptor es importante para la farmacocinética de los compuestos, especialmente para atravesar la membrana. Al resolver la ecuación QSAR se obtuvo el valor de 2 para $\Delta MLOGP_0$, por lo que las moléculas con valores más altos se verán afectadas por su mayor lipofilia. Teniendo en cuenta esta particularidad, tenemos otra característica para explicar la reducción de la actividad en **N1**, **N2**, **N7** y **N8**.

Estos resultados nos dan información sobre la importancia de las características estructurales (*ADDD* y *J3D*) y de los otros grupos funcionales mencionados en el QSAR (metoxi y ésteres). De hecho, nos ayudan a explicar por qué la contracción (*SPAN*) y la aromaticidad (*HOMA*) de la molécula son importantes para la actividad citotóxica. En el mismo aspecto, los resultados del *docking* ayudan a proponer una explicación de por qué **N2** y **N3** carecen de actividad biológica. No obstante, para analizar adecuadamente el modo de unión de estos compuestos, y la importancia del anillo trimetoxilado en este proceso, realizamos otro estudio de *docking*, pero esta vez utilizando una estructura cristalina de tubulina (PDB: 6BR1) unida a un inhibidor sin anillo trimetoxilado en su estructura (figura 4.1Sb). El sitio de unión es más pequeño y tiene una forma diferente (figura 4.1Sb) que el del cristal de 5XIW (figura 4.1Sa). En la tabla 4.2, se muestran todos los valores de energía de interacción (E_{inter}), de la mejor pose de cada candidato, de este procedimiento de acoplamiento. A partir de estos

resultados, podemos observar que E_{inter} de todos los compuestos se reduce, este efecto puede estar relacionado con la contracción del sitio de unión y la repulsión estérica que esto puede causar. La colchicina también sufre una reducción de su E_{inter} cuando se evalúa su unión en el cristal 6BR1, en concordancia con los resultados de nuestros candidatos. La colchicina se une de la misma manera en ambos cristales y llena el bolsillo de unión del inhibidor de pirimidina heterocíclica en 6BR1 (figura 4.4S). Un mayor descenso del valor de E_{inter} se produjo en **N5**, **N6** y **N9**, los tres candidatos con el segundo anillo trimetoxilado (tabla 4.2). Para el resto de los candidatos, los que no tienen segundo anillo (**N3** y **N4**) y los que tienen un segundo anillo no sustituido (**N2**, **N7** y **N8**), su valor de E_{inter} se vio menos afectado por el cambio en el cristal para el acoplamiento.

Tabla 4.2. Valores de energía de interacción (kcal/mol) obtenidos por el *docking* molecular en diferentes cristales de tubulina.

Molécula	5XIW	6BR1	Δ MLOGP	IC _{50ExpHeLa} (μ M)
N1	-7.8	-7.5	2.955	11.29 \pm 1.70
N2	-8.0	-7.4	3.242	>100
N3	-5.7	-6.1	1.526	>100
N4	-5.8	-6.1	1.765	68.70 \pm 19.24
N5	-7.9	-5.8	0.98	9.45 \pm 2.46
N6	-7.9	-6.1	1.501	7.26 \pm 0.68
N7	-8.1	-7.4	2.687	35.13 \pm 9.55
N8	-8.5	-7.1	3.062	43.48 \pm 9.78
N9	-7.9	-6.3	1.344	11.95 \pm 3.22
Colchicina	-10.4	-6.1	--	--
E3Y	-9.6	-9.0	--	--

En la figura 4.5 se muestra el modo de unión de la mejor postura de nuestros candidatos más activos (**N1** y **N5-N9**) en el cristal 6BR1. Para este cristal,

todos los compuestos se unen de forma similar, dirigiendo su segundo anillo al disolvente. En cuanto al cristal 5XIW, separamos los resultados de este *docking* para analizar mejor los cambios estructurales y su efecto en la unión. Para **N1**, **N7** y **N8**, se puede observar que conservan el mismo modo de unión que el mostrado en 5XIW, donde el anillo trimetoxilado se une en el bolsillo de la colchicina y el anillo no sustituido queda expuesto al disolvente. Este detalle explica la pequeña diferencia en los valores de E_{inter} en ambos cristales. Sin embargo, para el **N2** se consiguió un modo de unión diferente (figura 4.5S), uno similar al de los compuestos mencionados anteriormente, lo que explica su valor similar de E_{inter} . Por tanto, proponemos que la pérdida de actividad de este candidato se debe a su carácter farmacocinético menos favorecido, especialmente por su alto valor de $\Delta LOGP$ (basado en nuestro QSAR). Mientras que **N3** y **N4** se unen de la misma manera que en 5XIW, interactuando con su anillo metoxilado en el sitio de unión de la colchicina (figura 4.6S). Su E_{inter} tiene un valor pequeño, lo que explica su reducida actividad. En el cristal 6BR1, **N5**, **N6** y **N9** cambiaron su modo de unión respecto al mostrado en 5XIW. La cavidad de unión más pequeña y contraída dirigió su segundo anillo al disolvente de forma similar a los candidatos **N2**, **N7** y **N8**. Estos cambios en el modo de unión de **N5**, **N6** y **N9** pueden explicar el descenso de sus valores de E_{inter} . Sin embargo, el modo de unión de su anillo trimetoxilado, en el bolsillo de unión de la colchicina, se conserva en los dos cristales.

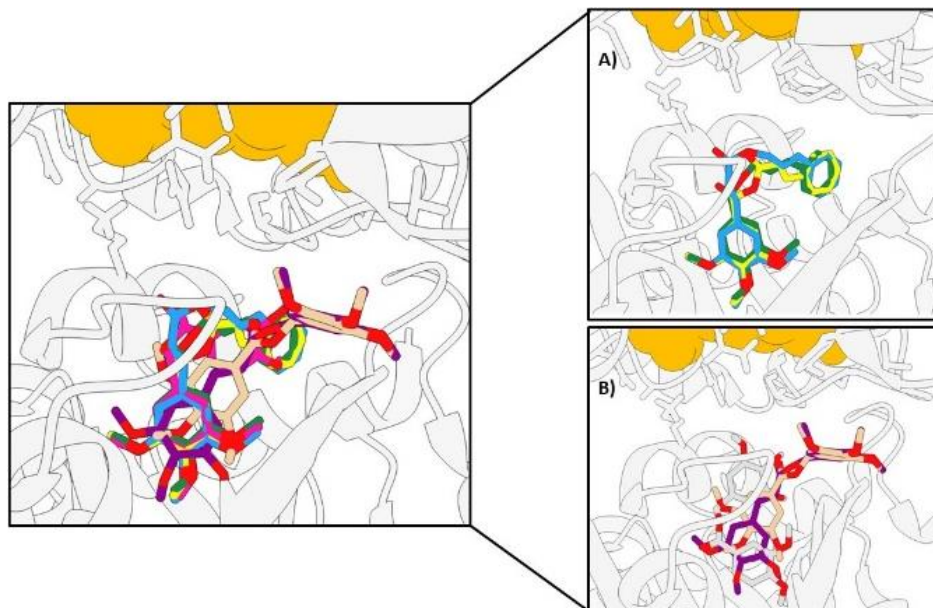


Figura 4.5. Modo de unión de N1, N5-N9 con la tubulina (PDB:6BR1). A) Modo de unión de N1, N7 y N8 con la tubulina. B) Modo de unión de N5, N6 y N9 con la tubulina. Todos los ligandos se muestran en representación de palos, los átomos de oxígeno están coloreados en rojo y los átomos de carbono están coloreados según cada compuesto: **N1** (verde), **N5** (marrón), **N6** (gris), **N7** (amarillo), **N8** (azul) y **N9** (morado).

De la figura 4.5 se desprende que nuestros candidatos con dos anillos aromáticos pueden separarse en dos clases de inhibidores de unión, los que tienen un anillo sustituido (**N1**, **N7** y **N8**), y los que tienen dos anillos sustituidos (**N5**, **N6** y **N9**). Se puede encontrar una correlación entre los valores de E_{inter} y de IC_{50} para la primera clase de inhibidores de unión (tabla 4.2). Los compuestos **N7** y **N8** son ésteres formados por dos anillos aromáticos, uno trimetoxi sustituido y el otro sin sustituir; por lo tanto, tienen cierta similitud con el compuesto **N1** (11.29 μM). Sin embargo, el **N7** presenta un $IC_{50expHeLa}$ de 35.13 μM , por lo que es aproximadamente tres veces menos eficaz que el **N1**. La diferencia estructural entre **N7** y **N1** es que en el compuesto **N1**, el grupo carbonilo está unido

directamente al anillo trimetoxilado; además, en el compuesto **N7**, la cadena que une ambos anillos tiene un enlace $\alpha\beta$ insaturado. Mientras que para el compuesto **N8**, la $IC_{50ExpHeLa}$ es de 43.48 μM , la diferencia estructural respecto a **N1** radica en la extensión de la cadena que une ambos anillos. En el caso de **N1**, el puente es de cinco átomos y un doble enlace; mientras que en el caso de **N8**, es de siete átomos y dos dobles enlaces; esto hace que **N1** sea aproximadamente cuatro veces más eficiente que **N8**. Además, sus valores de $\Delta LOGP$ complementan la explicación en las diferencias en los valores experimentales de IC_{50} en la línea celular HeLa. Estas diferencias en E_{inter} y $\Delta LOGP$ pueden explicarse por la cadena de carbono extendida entre los anillos aromáticos en **N8** en comparación con **N1** y **N7**.

En el caso de la segunda clase de inhibidores de unión, no existe un modo de unión conservado. Ya que **N5** y **N6** son muy similares, pero son muy diferentes a **N9**. Su cadena de carbono extendida y el grupo funcional éster posicionado de forma diferente pueden explicar los valores E_{inter} y $\Delta LOGP$ de **N9**. Esta cadena de carbono extendida empuja el segundo anillo hacia el disolvente generando el modo de unión mostrado en la figura 4.5. **N9** tiene un $IC_{50ExpHeLa}$ de 11.95 μM y es estructuralmente muy similar a **N7** y **N5** porque **N9** consiste en un sistema diarilo, con ambos anillos trimetoxilados. La diferencia entre **N9** y **N7** es la ausencia de metoxilos en uno de los anillos del **N7**, lo que conlleva una disminución de su actividad citotóxica. Mientras que entre **N9** y **N5**, la diferencia radica en la longitud de la cadena que une los anillos aromáticos, cinco y tres átomos respectivamente,

y en la presencia de un enlace $\alpha\beta$ insaturado en **N9**. Observamos que el aumento de la longitud de la cadena que une ambos anillos aromáticos disminuye la actividad citotóxica de **N9**. En general, podemos analizar que a medida que aumenta la distancia entre los anillos aromáticos de nuestros ésteres, la actividad citotóxica disminuye. Simultáneamente, la ausencia de metoxilos en las posiciones *meta* y *para* también puede disminuir la citotoxicidad. Lo anterior coincide con lo reportado por los grupos de Mannila (1993) y Zheng (2014), respectivamente, sobre los derivados de CA-4.

Un detalle importante para resolver era el modo de unión de **N6** y su relación con su mejor capacidad citotóxica. Por lo tanto, se realizó un estudio exhaustivo de todos los posibles modos de unión de **N5** y **N6**. **N5** era el mejor compuesto para comparar con **N6**, ambos están constituidos por dos anillos aromáticos, ambos con sustituyentes metoxilo; estos anillos están unidos por una cadena de tres átomos, incluido el oxígeno. **N6** carece del grupo metoxilo en la posición 5; la ausencia de este sustituyente mejora ligeramente el efecto citotóxico experimental de **N6** ($7.26 \pm 0.68 \mu\text{M}$) con respecto a **N5** ($9.45 \pm 2.46 \mu\text{M}$). Esto coincide con lo reportado por los grupos de Pang en 2017 y Pettit en 2005 al analizar que un aumento de metoxilos en estructuras como nuestros derivados de AG disminuye su efecto citotóxico. Debido a que puede estar ocurriendo un impedimento estérico con el receptor, es esencial mencionar que el compuesto **N6** tiene una estructura parecida a la combretastatina 4 (CA-4); por lo tanto, esto

refuerza la posibilidad de que nuestro derivado **N6** interactúe en el sitio de unión de la colchicina en la tubulina.

En la figura 4.6 se muestran los dos modos de unión más estables en la tubulina del derivado **N5**, utilizando el cristal 6BR1. Con esta figura podemos observar que la mayoría de las interacciones son de tipo hidrofóbico, ya que este bolsillo de unión posee un carácter lipofílico denotado por el color de su superficie (verde); escala Kyte-Doolittle. La pose 1 (figura 4.6a) se une con un valor de E_{inter} de -5.8 kcal/mol ligeramente mejor que la pose 2 (figura 4.6b) con un E_{inter} de -5.7 kcal/mol. Estos resultados se pueden asociar al mejor ajuste y al patrón de interacción debido a su éster aromático. En este cristal podemos ver que al insertar **N5** en el bolsillo de unión de la colchicina con el primer anillo, el grupo éster genera interacciones favorecidas, al igual que en el cristal 5XIW donde se forma un HB con Asn256 como se muestra en la figura 4.7S.

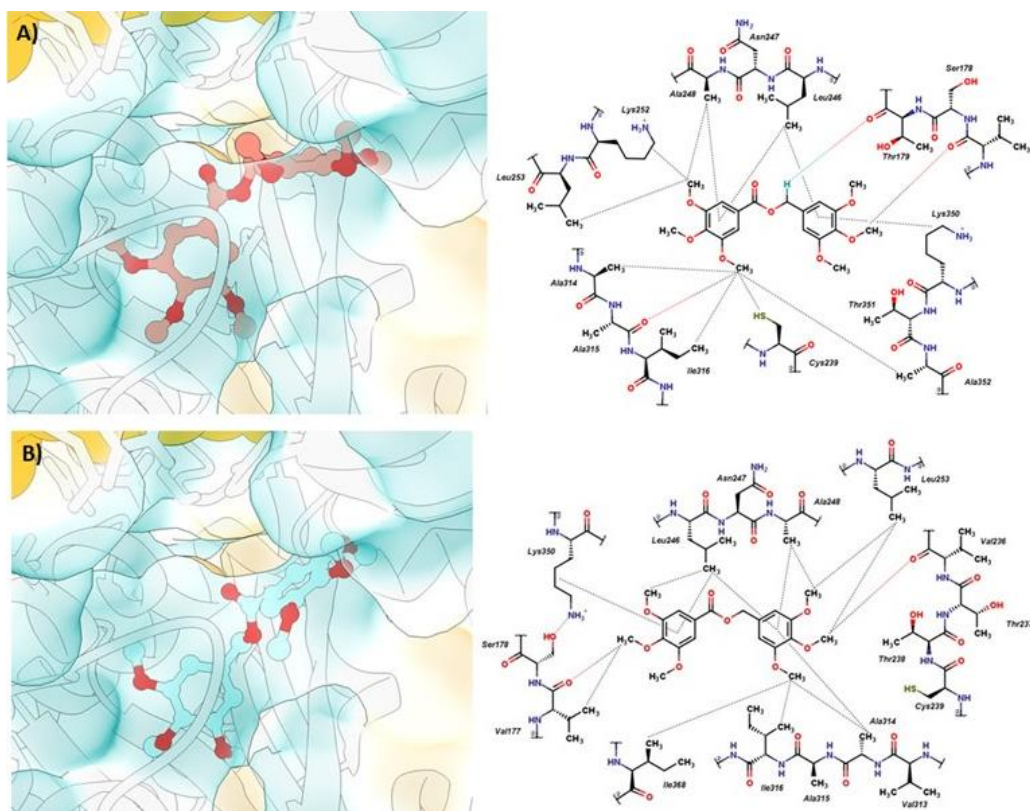


Figura 4.6. Modos de unión de N5 con el cristal de tubulina 6BR1. A) Postura de unión de **N5** en la cavidad de la colchicina por medio de su anillo 1. B) Postura de unión de **N5** en la cavidad de la colchicina por medio de su anillo 2. Los residuos que interactúan se muestran en representación de bola y palo. Gráficos de superficie de la lipofilia de los aminoácidos, la escala Kyte-Doolittle.

En la figura 4.7 se muestran los dos modos de unión más estables del **N6** en la tubulina, utilizando el cristal 6BR1. Para la pose 1 (figura 4.7a) se une con un valor de energía de interacción (E_{inter}) de -6.1 kcal/mol ligeramente mejor que la pose 2 (figura 4.7b) con un E_{inter} de -5.8 kcal/mol. Este resultado puede asociarse al mejor ajuste y al patrón de interacción debido a su éster aromático, como para

N5. Para esta molécula la formación de HB en la pose 1 puede ayudar a explicar su mayor actividad citotóxica.

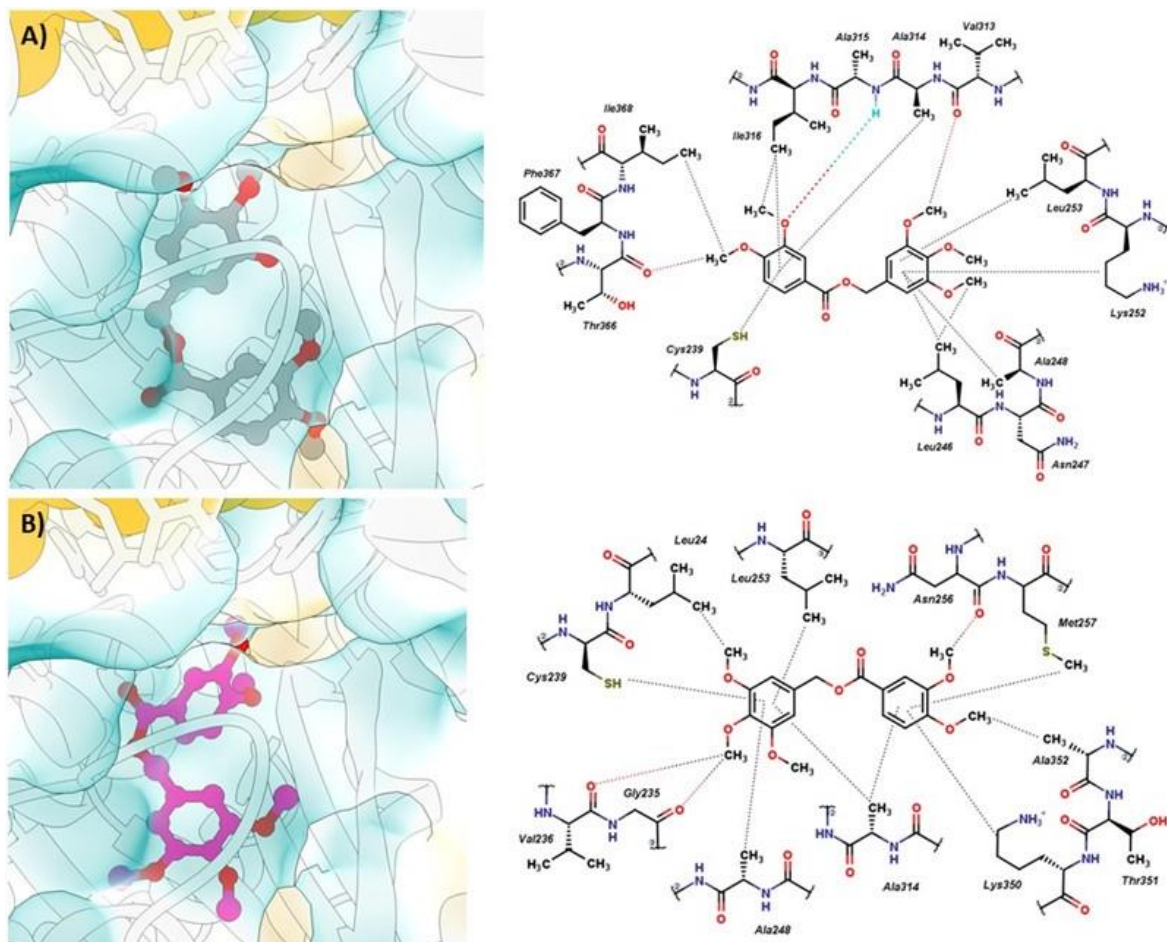


Figura 4.7. Modos de unión de N6 con el cristal de la tubulina 6BR1. A) Postura de unión de **N6** en la cavidad de la colchicina por medio de su anillo 1. B) Postura de unión de **N6** en la cavidad de la colchicina por medio de su anillo 2. Los residuos que interactúan se muestran en una representación en forma de bastón. Gráficos de superficie de la lipofilia de los aminoácidos, la escala Kyte-Doolittle.

4.4 CONCLUSIONES

Una vez que se evaluaron *in vitro* nuestros nueve derivados (**N1-N9**), se determinó que los mejores resultados de actividad citotóxica se obtuvieron con **N1**,

N5, **N6** y **N9** en la línea celular HeLa; mientras que en la línea celular HaCaT no presentan actividad citotóxica relevante; es decir, nuestros derivados tienen un efecto selectivo a la línea cancerígena.

El compuesto **N6** fue el más activo y estructuralmente parecido a la combretastatina; además, en nuestro análisis QSAR, **N6** tuvo una buena predicción de su $IC_{50ExpHeLa}$. Analizando la estructura y actividad de nuestros compuestos (excepto **N3** y **N4**) se determinó que cumplen ciertas relaciones presentes en una amplia variedad de derivados de CA-4; así como también observamos que el motivo trimetoxibenceno de nuestros derivados de AG proporciona una similitud sobre otras moléculas de tipo CBSI. Mientras que el alineamiento estructural realizado nos permitió observar la relación entre **N1**, **N5** y **N6**, respecto a otras moléculas que se unen a la tubulina, específicamente en el sitio de la colchicina. Esto nos llevó a proponer que nuestros derivados pueden ejercer su efecto citotóxico mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina al unirse al sitio de la colchicina. Y esta hipótesis de manera general se pudo sustentar a través de diversos acoplamientos moleculares de nuestros derivados con los cristales 5XIW y 6BR1. Se observó relación entre E_{Inter} , los valores de $IC_{50ExpHeLa}$ y los valores de $MLogP$ de los derivados. Finalmente, la moderada actividad citotóxica y la fácil síntesis de nuestros derivados los convierten en moléculas de interés para futuros análisis.

4.5 REFERENCIAS

1. Yang J, Yan W, Yu Y, Wang Y, Yang T, Xue L, et al. The compound millepachine and its derivatives inhibit tubulin polymerization by irreversibly binding to the colchicine-binding site in β -tubulin. *J Biol Chem*. 2018;293(24):9461–72.
2. Banerjee S, Arnst KE, Wang Y, Kumar G, Deng S, Yang L, et al. Heterocyclic-Fused Pyrimidines as Novel Tubulin Polymerization Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site: Structural Basis and Antitumor Efficacy. *J Med Chem*. 2018;61(4):1704–1718.
3. Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, Rippmann F, Rarey M. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J Chem Inf Model*. 2012;52(2):360–72.
4. Schöning-Stierand K, Diedrich K, Fährrolfes R, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, et al. ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2020;48:W48–53. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/48/W1/W48/5820880>
5. Fährrolfes R, Bietz S, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, Otto T, et al. Proteins Plus: A web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W337–43.
6. 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*. 2009;31(2):NA-NA.
7. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic Med Chem*. 2005;13(21):5892–908.
8. Mannila E, Talvitie A, Kolehmainen E. Anti-leukaemic compounds derived from stilbenes in *Picea abies* bark. *Phytochemistry*. 1993;33(4):813–6.
9. Pettit GR, Rhodes MR, Herald DL, Hamel E, Schmidt JM, Pettit RK. Antineoplastic agents. 445. Synthesis and evaluation of structural modifications of (Z)- and (E)-combretastatin A-4. *J Med Chem*. 2005;48(12):4087–99.
10. Tron GC, Pirali T, Sorba G, Pagliai F, Busacca S, Genazzani AA. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *ChemInform*. 2006;37(34).
11. Hura N, Sawant A V., Kumari A, Guchhait SK, Panda D. Combretastatin-Inspired Heterocycles as Antitubulin Anticancer Agents. *ACS Omega*. 2018;3(8):9754–69.
12. Yang F, Yu LZ, Diao PC, Jian XE, Zhou MF, Jiang CS, et al. Novel [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives as potent antitubulin agents: Design, multicomponent synthesis and antiproliferative activities. *Bioorg Chem [Internet]*. 2019;92(September):103260. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103260>
13. Tian C, Chen X, Zhang Z, Wang X, Liu J. Design and synthesis of (2-(phenylamino)thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone analogues as potent anti-tubulin polymerization agents. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2019;183:111679. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111679>
14. Salum LB, Altei WF, Chiaradia LD, Cordeiro MNS, Canevarolo RR, Melo CPS, et al. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2013;63:501–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.037>
15. Lai Q, Wang Y, Wang R, Lai W, Tang L, Tao Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of a novel tubulin inhibitor 7a3 targeting the colchicine binding site. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2018;156:162–79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.010>
16. Zheng S, Zhong Q, Mottamal M, Zhang Q, Zhang C, Lemelle E, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel pyridine-bridged analogues of combretastatin-A4 as anticancer agents. *J Med Chem*. 2014;57(8):3369–81.
17. Pang Y, An B, Lou L, Zhang J, Yan J, Huang L, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Selenium-Containing Isocombretastatins and Phenstatins as Antitumor Agents. *J Med Chem*. 2017;60(17):7300–14.

4.6 ANEXOS

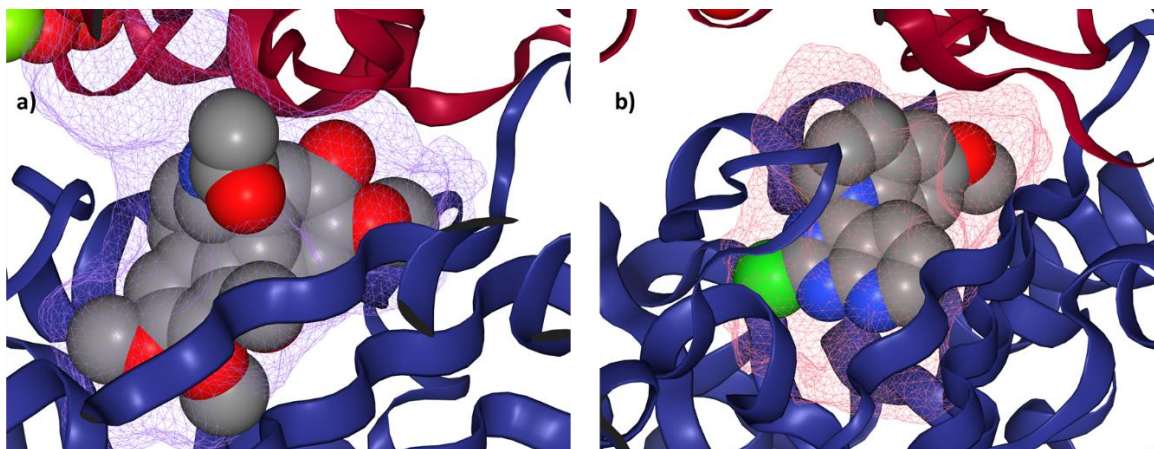


Figura 4.1S. Representaciones del sitio de unión a la colchicina de los cristales de tubulina **5XIW** y **6BR1**. a) Unión de la colchicina (representación de relleno del espacio) sobre un bolsillo de tubulina (**5XIW**) (color violeta, $V= 715,26 \text{ \AA}^3$). b) Unión de la pirimidina heterocíclica (representación de relleno del espacio) sobre un bolsillo de tubulina (**6BR1**) (color rosa, $V= 546.43 \text{ \AA}^3$).

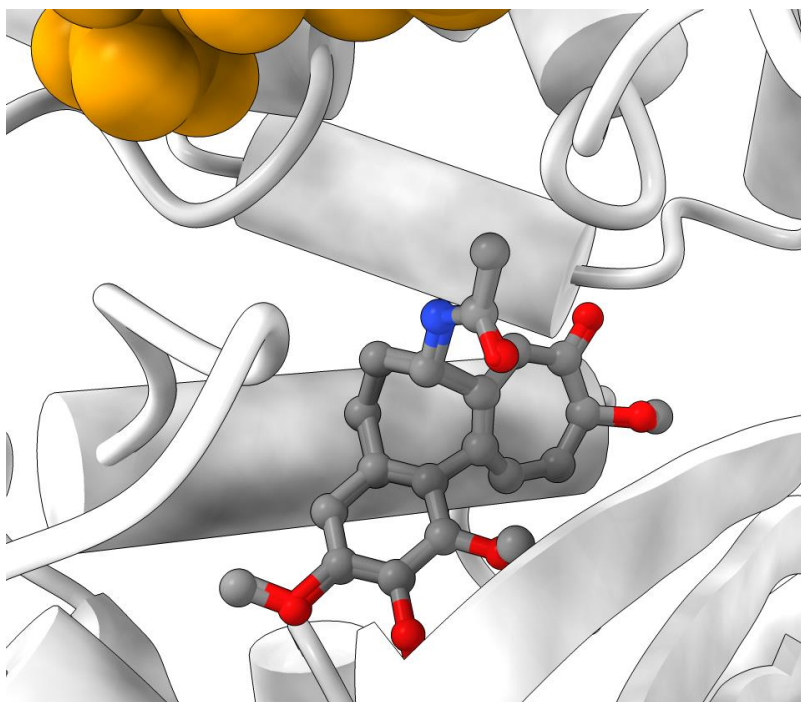


Figure 4.2S. Estructura cristalina del complejo colchicina-tubulina (PDB:5XIW) con la pose superpuesta del ligando obtenida a partir del docking (RMSD= 0,2). La conformación obtenida a partir del cálculo de acoplamiento se muestra en una representación de palos, y la conformación del cristal en una representación de bolas y palos.

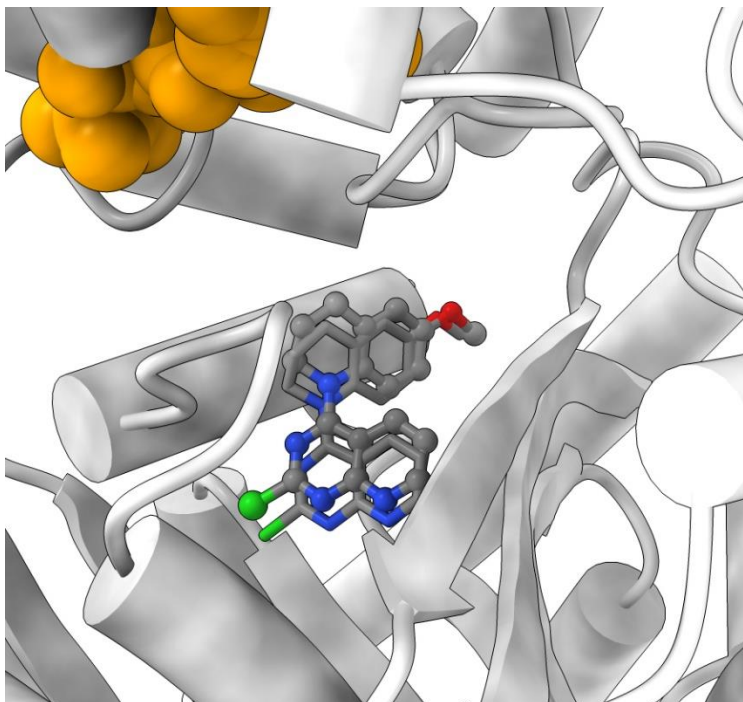


Figure 4.3S. Estructura cristalina del complejo heterocíclico pirimidina-tubulina (PDB:6BR1) con la pose superpuesta del ligando obtenida del docking (RMSD= 0.8). La conformación obtenida a partir del cálculo de docking se muestra en una representación de palos, y la conformación del cristal en una representación de bolas y palos.

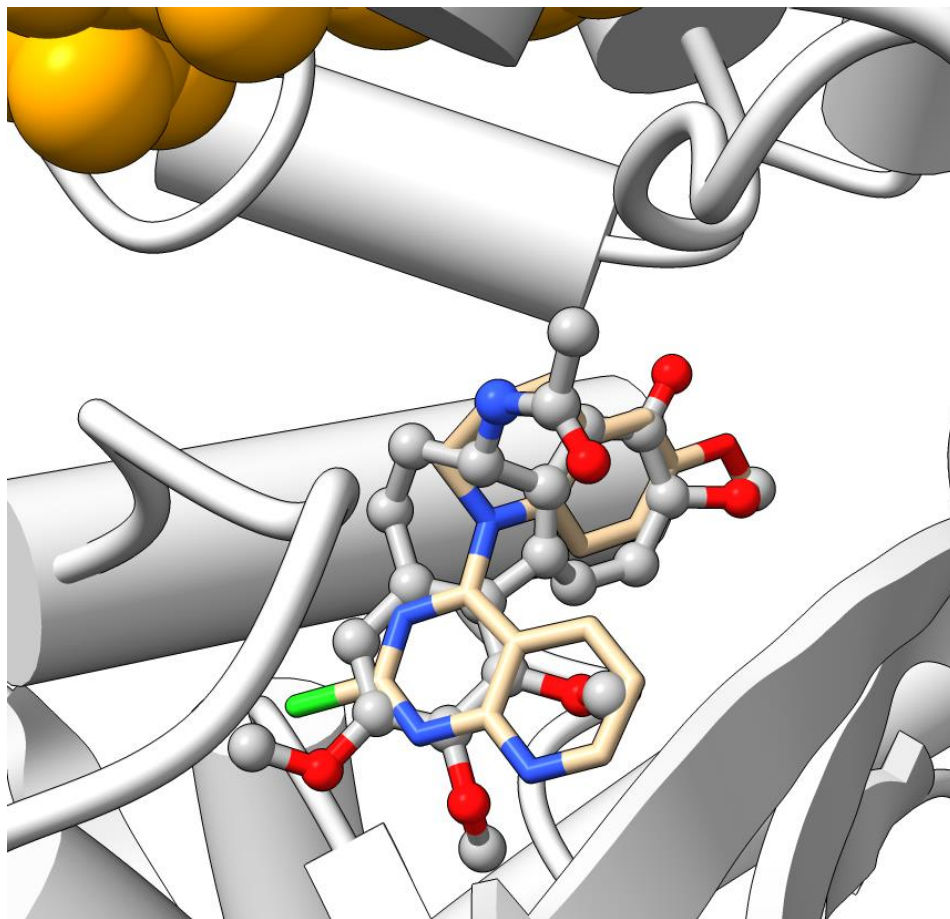


Figure 4.4S. Estructura cristalina del complejo α -tubulina (PDB:6BR1) con la pose superpuesta de la colchicina obtenida del docking. La colchicina se muestra en una representación de bola y palo, y la pirimidina heterocíclica en una representación de palo. Los átomos de oxígeno y nitrógeno están coloreados en rojo y azul respectivamente, y los átomos de carbono están coloreados según la molécula.

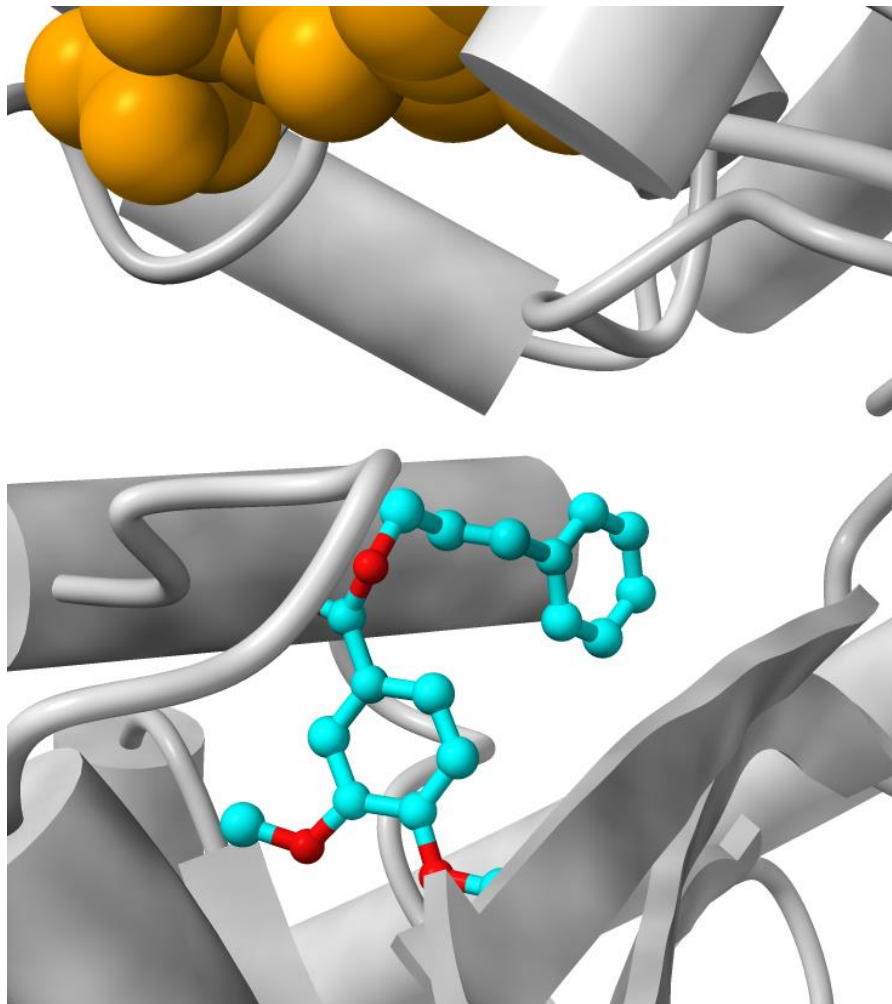


Figure 4.5S. Estructura cristalina del complejo β -tubulina (PDB:6BR1) con la pose N2 obtenida del docking. N2 se muestra en una representación de bola y palo. Los átomos de oxígeno están coloreados en rojo y los de carbono en cian.

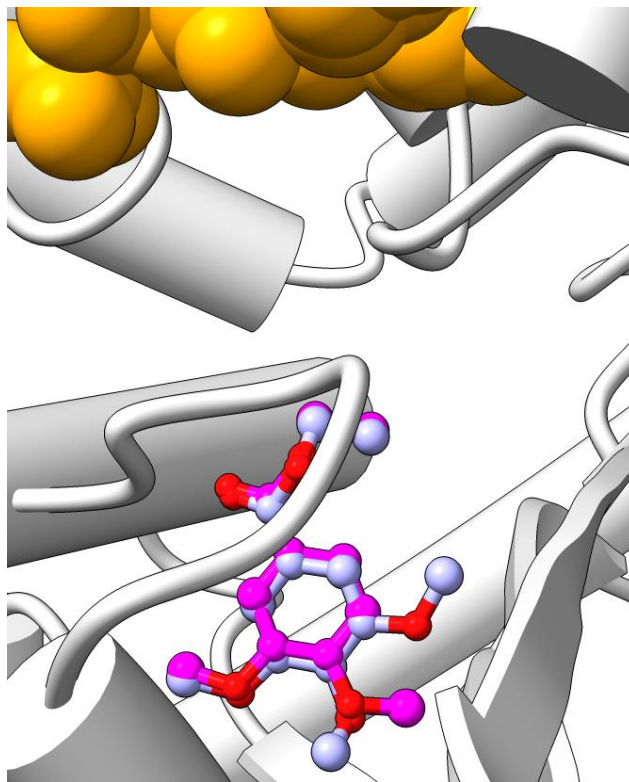


Figure 4.6S. Estructura cristalina del complejo de α -tubulina (PDB:6BR1) con las posturas N3 y N4 obtenidas mediante docking. **N3** y **N4** se muestran en una representación de bola y palo. Los átomos de oxígeno están coloreados en rojo y los átomos de carbono en función de la molécula: **N3** (azul) y **N4** (morado).

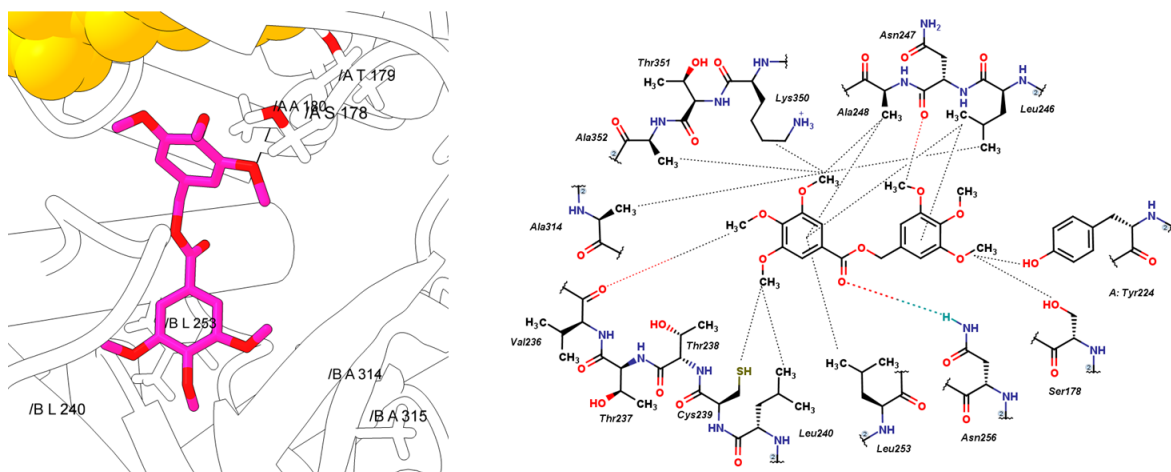


Figure 4.7S. Modos de unión de N5 con el cristal de tubulina 5XIW. Los residuos que interactúan se muestran en representación de bola y palo.

DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **Análisis *in silico* e *in vitro* del efecto citotóxico de derivados del ácido gálico en células de cáncer cervicouterino HeLa**, que presenta la alumna **Ninfa Yaret Nolasco Quintana (5620141201)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Juan José Acevedo Fernández FM-UAEM	APROBADO	
Dr. José Luis Medina Franco FQ-UNAM	APROBADO	
Dr. Enrique Salas Vidal IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Laura Patricia Alvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2022-09-26 11:43:33 | Firmante

kbsnoT+shyMxshYvVreVt0mHx5dsQ7KktBjnNC4OkEOnDXR8Ce5sNdxkRkEcAmcAqLzVG/EGvYdO9Qai+Cmd7XXthRdFmlw00SEpyyc1E11zLunlYV5BgPI4NZ373E8o7ZPndc
HI4D1WckMWHwMa3tR2fjVeoF1xQmQx/GNESwnBJfZwtOBMEqOyiWq3+4NypcxpjxJcQo1b4wUTR8QLprszQAFrx0YKIA1Au9P0mw1MMuxFJgGhP4ifbtG4mdkom+JfCfCLS
GS1udytcvlotY8wbrYDfWoLa3Rq1SqwwJ6lqYfjo3qVf9IVGRhrL6lsmeeZJK7dRSDxPE2Gq7A==

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2022-09-26 12:04:19 | Firmante

G6l3tdJ48rAUulr247MB13WUuijWNHA1i5zd7gWbG3YVoP6wQa43i+LCDjTbs7vJtG/Jguq8C/7qJNCKiGwZJEqtHmcrqHgrcB0ovDQTKfljAFMINSj+Z0JAMDelm1nrwHg24ARV
Lxs/u9RvzSSqF+ojHChf1iS2SGSftWsh0yDq5ctORQwS+DhzUkOwr6ECo5860KITn3w9RB4UFPzhisRAW2CU83wTWefmZNGTbSrEbuXiQ4IN5DFzcT8jld+EUZPsoyhwUU00N
EE6hyJ1oQ3KHLRQe+u8AMQAOL7i2EafvM4iaX8D1Jl3C3wjdzYDmZw4sEQzgr94m4LiRw==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-09-26 12:08:19 | Firmante

F6pga7nWRc7TtY/9MPXLd7zAjhCM2Y35M/MWP6iBduwV7oh1AgvbtTPr8Wf01qudRWJrxRkzV8k1hZ/ptrbDwtFZT74CmpsPAZpOKyXz+UM1XzxSjpybx1Zz+ULjyObHoltaggwWi
O3p9FXcRf6vzNVU7luPiiuJJPaiOkaqepuP7LBxa3noM54Y6BgPPPjfbqDXytUCHyk86Yom8KnTXLRKn/CE4B+pex2M+ccUFSoinyEPWeJ4yyo849uKXmRUFEewzq9QGJcp7
mbuMfmrkeQDxda/n82z93JL355R5yo44kN0fCIK2EFblQxWAzd5/kfXj6Vx+RPkp2uT/A==

JOSE LUIS MEDINA FRANCO | Fecha:2022-09-26 14:29:16 | Firmante

9KvgvvpkjbjgWwhngkgE//oNgLzoPgQks6xbbVwiVotKmU3aMKXZ5jpwrlIE0QsXl8Gmq53MkZ82dG/ketwMpBi88i/uSupgJYi3npTWlvfChJimyaSFghKODdzVvJBoi0jZnQ9IOaTgl
cv2O037DoVTTuXFgyhQBLddzmlCQF+iUNJ93EBP+FnnvcXKu/XGU3iRnLd+E7rCpcuhGfoil6u+CtYHqbpYE4sRFk7S97KpAdhKZ06M0aXUdFuZnuYJD3DcSjvhooeOqvGf
MI0dnta6wPMdTzQLfrAXDzeVR4VX6Lq40FqMEy1rtYMVVWgSDc48roB1qrelAsH87g==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-09-26 16:43:42 | Firmante

NDtqwl36JA1W971Ej2fEvRaGglvQmWEFvY0mLUiBai6annVTfob8KbuudhwtOjDVNkET6n/qtggMCTMmf9jKau70D4hblgJkoUm2OZmn10rU+uptW1yAoyBY1KCS1lv+t3Epz+HY
S91iOfRdlWwup+IFy+BvzFM6WEhgWRD1Xao/7zJsiR6NRPy8GW5T8oBCZ61x1xpUcWv14PgUUXkHHiO6fsHTM9MZalVgtp7JVB1QPFPtb/rP+jwKRdo/TziodEpw8sSO0JQ7Th
XjHFNofAHqIOIqQp/y6W78Ccnd7HD9VQDxC8Aoljrg3lj5fVAUF+HXGFwAK8m4/znNg==

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2022-09-26 21:39:14 | Firmante

I5aTDBOaiGh+7NShjUgWRclpRNGIPQOh1NL/KtQj5a5Esoth7iGDB/smMb7dbB7eFoiGz9onaJhYUicG/X5Zfi4RbW02MxCFRiQDt8Q7aSWK2uam7ee5+Wc0EE311J9i2c9b/H
gBLa2nnFkMpe99w/1BUShD4bdJIDNB7ebP6XrObhQldVXGTG9/wm00wYcMvaidsqhWQnjB/WTIdcr9bbv3+sV8brlyZsTEy+A9NYPHEIQMB87ilhMwvhkzR+KOE+EAyYzTwm
FX2oLjZXKuuW9Xkj7HjHTAHEvejUdQ+wzC2rCxmoKh8MNgthSBKOCYRE3gM0mx1lq2zWHLAQ==

ENRIQUE SALAS VIDAL | Fecha:2022-09-27 11:16:47 | Firmante

UGxfhoW1u7devdJDDOLtXfBqrRUBfMaBhZVSKLQyvPaSKYf3LwV64ZV80KUoXnPrriActq7mdJVfVqq0NRsitHsN2hKJh8jfd3Yloa08IEeRtmM/D2xGEq5KgC8TghEzKtGsJColp7
sTSyifbt0713BskSCbeN7d5pyQTQH1B9JqJNfPzGLCu7vaHDMqpH788lwCjA9MXs6l7bvzscvRS7uYqQukXli9b0q9ntVYi6JrbTlatiE+dsTY+cjOjUWkYJWACOpvGqf2WcaEu
7yCwRvMnOsnngS9x7B09IRQo0zfpUscXoY43scHm7hqsikfG/dhWmUrNqFA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ueC6soRgD

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/e43xwPYiS3gCL2mPnSqHtodxNtKI0d9M>