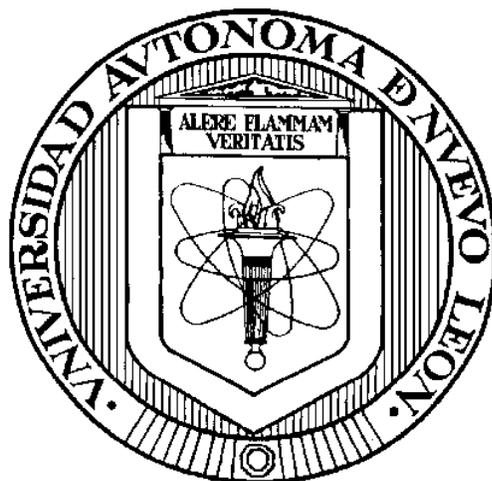


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS
COMPUTACIONAL DE HÍBRIDOS DE ISATINA Y SU EVALUACIÓN
CITOTÓXICA**

POR

Q.F.B. BRYAN ALEJANDRO ESPINOSA RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE **MAestrÍA EN CIENCIAS** CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA

Vo.Bo.

JULIO, 2020

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS
COMPUTACIONAL DE HÍBRIDOS DE ISATINA Y SU EVALUACIÓN
CITOTÓXICA**

Aprobación de tesis:

Dr. Isaías Balderas Rentería

Director de Tesis

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

Codirector de Tesis

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

Comité tutorial

Dra. María del Rosario González González

Comité tutorial

Dra. Karla Ramírez Estrada

Comité tutorial

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS
COMPUTACIONAL DE HÍBRIDOS DE ISATINA Y SU EVALUACIÓN
CITOTÓXICA**

Aprobación de tesis:

Dr. Isaías Balderas Rentería

Presidente

Dra. María del Rosario González González

Secretaría

Dra. Karla Ramírez Estrada

Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Subdirectora de Posgrado

RESUMEN

Nombre: Bryan Alejandro Espinosa Rodríguez

Fecha de Graduación: agosto 2020

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE HÍBRIDOS DE ISATINA Y SU EVALUACIÓN CITOTÓXICA.

Número de páginas: 214

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en farmacia.

Área de estudio: Síntesis de moléculas con actividad biológica

Propósito y método de estudio: El cáncer se considera problema de salud pública creciente a pesar de ser la patología que más terapias presenta. Lamentablemente, la quimioterapia, el tratamiento más empleado, sigue estando lejos de ser eficiente por la elevada toxicidad que presenta. Por este motivo, se llevó a cabo la siguiente metodología: primero se diseñaron moléculas híbridas basadas en isatina mediante métodos computacionales. Posteriormente, se sintetizaron las moléculas mediante

una reacción de formación de iminas y se purificaron mediante recristalización. Además, los compuestos puros se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas. Finalmente, se evaluaron las moléculas en dos líneas celulares inmortalizadas, MCF-7 y PC-3, de cáncer de mama y próstata, respectivamente, y una línea celular no inmortalizada, VERO.

Contribuciones y conclusiones: Se logró llevar a cabo el diseño de nueve moléculas promiscuas basadas en isatina mediante métodos computacionales. Además, se sintetizaron seis de las siete moléculas que se pretendían sintetizar mediante una reacción de formación de iminas con rendimientos buenos a moderados, y que permitía una purificación rápida. A través de las técnicas espectroscópicas RMN-¹H y RMN-¹³C se logró confirmar la estructura química de las moléculas sintetizadas. Finalmente, se evaluaron los seis compuestos en las líneas celulares inmortalizadas y la línea celular no inmortalizada, lo que condujo a la identificación del compuesto B-09 como el único compuesto citotóxico en todas las líneas celulares.



Dr. Isaías Balderas Rentería

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero dar las gracias a Dios por haberme dado la oportunidad de concluir esta meta, y por haberme dado la oportunidad de estudiar y entender un cachito de todos los sistemas celulares y moleculares que él creó.

Una vez finalizados los agradecimientos con el santísimo, quisiera agradecer a mi familia. Siempre estuvieron ahí para apoyarme durante mi carrera y mi maestría. Espero sigan estando conmigo en el siguiente paso. Y espero hacer cosas tan grandes, o que al menos haga algo, con todos los conocimientos que adquiera en este grado. Cosas que estén a la altura de todos los sacrificios que han hecho por mí hasta ahora.

Amigos... bueno yo nunca me he caracterizado por tener muchos amigos, pero en este caso eso es algo bueno. Si tuviera muchos amigos tendría que agradecerles a todos, y ya con unos pocos estoy batallando para escribir estas palabras. Pues bueno, seré breve quiero agradecerle a Diego, José Luis y Jaime, mis mejores amigos al momentos de escribir esto, y espero que lo sigan siendo al momento de ganarme un nobel o algo así. Básicamente ustedes hicieron muchísimo más ameno todos estos dos años. Y bueno, no solo tengo amigos hombres, también tengo algunas amigas a las que quisiera agradecer o al menos hacerles mención: Aissa y Cristina. Con ustedes dos en especial descubrí que me gusta mucho enseñar. Bueno, yo creo que son todos.

Continuando con los agradecimientos, ahora le toca al Dr. Isaías. Bueno, primero que todo, a usted le tengo que agradecer que me haya aceptado como su alumno

en este grado de maestría. Le tengo que agradecer todos los consejos personales y académicos tan acertados que me ha dado. Le tengo que agradecer que me haya dado la oportunidad de dar clases, y confirmar que amo enseñar. Y bueno, para finalizar creo que lo que más le tengo que agradecer es que me haya dado su amistad... a usted yo no lo considero un simple amigo, tal vez algo más como un guía o un segundo padre. ¡Muchas gracias!

Iris...la verdad no sé cómo agradecerte todo lo que has hecho por mí, y en todas las decisiones que me has apoyado. Podría decir que es verdad el dicho “Detrás de un gran hombre hay una gran mujer” pero no me gusta, porque no quiero que estés por detrás de mí, quiero que estés a mi lado. Quiero ser un gran hombre, un gran científico, quiero ser un buen esposo, porque es lo menos que te mereces, porque tú ya eres una gran mujer, una gran profesional, y sé que serás una gran esposa. ¡Te amo!

Y bueno, ya que terminamos con los sentimentalismos, quisiera agradecer a otras personas e instituciones que son muy importantes. Sin estas, nada de este proyecto se hubiera llevado a cabo. Entre estas personas quiero darle las gracias al Dr. Eder y a Elizeth del Laboratorio de Farmacología Molecular por toda la asesoría que me brindaron, por molestarlos tanto tiempo, y por permitirme utilizar las instalaciones. De la misma manera, quiero agradecerle a la Dra. Patricia y a David del Laboratorio de Biofarmacia por su compañía, su amistad y toda la ayuda que me brindaron estos dos años. De manera más general quisiera agradecer a todos mis maestros de la Facultad de Ciencias Químicas, a la misma Facultad, y a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Por último, pero no menos importante, quisiera agradecer a CONACYT por la beca que me otorgaron. Sin esa beca nada de esto hubiera sido posible.

Con esto finalizó los agradecimientos. Gracias a ti, lector, por leer esto.

“Algún día tal vez saldrá a la luz una de las ironías de la naturaleza... que el cáncer, responsable de muchas muertes, está conectado muy indisolublemente con la vida”

-C. Oberling, 1946.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ESQUEMAS.....	xix
NOMENCLATURA.....	xx
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 ¿Qué es el cáncer?	1
1.2 Epidemiología del cáncer	2
1.2.1 Morbimortalidad del cáncer: un problema de salud pública	2
1.2.2 Los tipos de cáncer más comunes en México y el mundo	3
1.2.3 Cáncer, más que un problema de salud.....	8
1.3. Biología celular y molecular del cáncer	9
1.3.1 Señalización proliferativa sostenida	10
1.3.2 Evasión de los supresores del crecimiento	11
1.3.3 Evasión de la destrucción por el sistema inmune.....	13
1.3.4 Activación de la inmortalidad replicativa.....	14
1.3.5 Inflamación promotora de tumores.....	16
1.3.6 Activación de la invasión y metástasis	17
1.3.7 Inducción de la angiogénesis	19
1.3.8 Inestabilidad genómica y mutaciones.....	21
1.3.9 Resistencia a la muerte celular	22
1.3.10 Desregulación de la bioenergética celular.....	26
1.4 La importancia del microambiente tumoral	27
1.5 Células madre cancerosas	30

1.5.1 Células madre	30
1.5.2 Células madre cancerosas	32
1.6 Los tres pilares de la terapia contra el cáncer	34
1.6.1 Cirugía.....	34
1.6.2 Radioterapia.....	37
1.6.3 Quimioterapia.....	39
1.7 Promiscuidad molecular: un nuevo enfoque en la farmacología	45
CAPÍTULO II.....	49
ANTECEDENTES.....	49
2.1 Fármacos promiscuos en el cáncer: metformina, un ejemplo de promiscuidad molecular	49
2.2 Productos naturales como fuentes de fármacos promiscuos	52
2.3 Isatina, indol-3-carbinol y el grupo sulfonamida.....	53
2.4 Híbridos de isatina.....	58
CAPÍTULO III.....	65
3.1 Justificación	65
3.2 Hipótesis.....	65
3.3 Objetivos.....	66
3.3.1 Objetivo general	66
3.3.2 Objetivos específicos	66
CAPÍTULO IV	67
MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	67
4.1 Materiales.....	67
4.2 Reactivos.....	69
4.3 Equipos y ubicación.....	71

4.4 Metodología.....	73
4.4.1 Diseño y análisis computacional de los híbridos de isatina.....	73
4.4.2 Síntesis química de los híbridos de isatina	86
4.4.3 Caracterización estructural de los híbridos de Isatina	88
4.4.4 Evaluación de citotoxicidad de los híbridos de isatina.....	90
4.4.5 Disposición de residuos	96
Capítulo V	98
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
5.1 Resultados y discusión del diseño y análisis computacional	98
5.1.1 Diseño de híbridos de isatina	98
5.1.2 Predicción de dianas moleculares de los híbridos de isatina	105
5.1.3 Acoplamiento molecular de los híbridos de isatina.....	109
5.1.4 Modelado molecular de los híbridos de isatina	112
5.1.5 Estimación de las propiedades farmacocinéticas.....	117
5.2 Resultados y discusión de la síntesis química.....	121
5.2.1 Síntesis química	121
5.2.2 Purificación de la reacción	126
5.3.3 Rendimientos de reacción.....	127
5.3.4 Relación del mecanismo de reacción de la formación de iminas con los rendimientos obtenidos	131
5.3 Resultados y discusión de la caracterización estructural	134
5.3.1 Elucidación estructural de B-01	135
5.3.2 Elucidación estructural de B-05.....	144
5.3.3 Elucidación estructural de B-09.....	150
5.3.4 Elucidación estructural de B-02, B-06, y B-08.....	153

5.4 Resultados y discusión de la evaluación de citotoxicidad	155
5.4.1 Evaluación general en la línea celular MCF-7	157
5.4.2 Determinación del IC ₅₀ de B-09 y lapatinib en MCF-7	158
5.4.3 Evaluación general en la línea celular PC-3.....	160
5.4.4 Determinación del IC ₅₀ de B-09 en PC-3.....	161
5.4.5 Evaluación general en la línea celular VERO.....	162
5.4.6 Determinación del IC ₅₀ de B-09 en VERO.....	163
5.4.7 Análisis de la actividad biológica de los híbridos de isatina	165
Capítulo VI.....	169
CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y REFERENCIAS	169
6.1 Conclusiones	169
6.2 Perspectivas	170
6.3 Apéndices.....	172
6.3.1 Modelado molecular	172
6.3.2 Espectros de resonancia magnética de protón y carbono 13....	176
6.4 Referencias	182

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Materiales para el diseño computacional de los híbridos de isatina.	67
Tabla 2. Materiales para la síntesis química de los híbridos de isatina.	68
Tabla 3. Materiales para la evaluación biológica.	68
Tabla 4. Reactivos para la síntesis química de los híbridos de isatina.	69
Tabla 5. Reactivos para la evaluación biológica de los híbridos de isatina.....	70
Tabla 6. Equipos para la síntesis química de los híbridos de isatina.	71
Tabla 7. Equipos para la evaluación biológica de los híbridos de isatina	72
Tabla 8. Clasificación de residuos químicos y biológicos del reglamento de la FCQ.	96
Tabla 9. Dianas moleculares predichas por la herramienta SwissTargetPrediction para los híbridos de isatina.....	106
Tabla 10. Energías de afinidad (kcal/mol) predichas por el acoplamiento molecular entre los híbridos de isatina y proteínas selectas utilizando AutoDock 4.	110
Tabla 11. Constantes de disociación predichas (μM o nM) por el acoplamiento molecular entre los híbridos de isatina y proteínas selectas utilizando AutoDock 4.	110
Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos estimados de los híbridos de isatina. ...	117
Tabla 13. Rendimientos de reacción de la síntesis de los híbridos de isatina. ...	129
Tabla 14. Señales obtenidas de los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de los híbridos de isatina B-02, B-06 y B-08.....	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia por tipo de cáncer a nivel mundial en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.	6
Figura 2. Mortalidad por tipo de cáncer a nivel mundial en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.	6
Figura 3. Incidencia por tipo de cáncer a nivel nacional en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.	7
Figura 4. Mortalidad por tipo de cáncer a nivel nacional en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.	7
Figura 5. Estructura química del indol (a) y de la isatina (b).....	54
Figura 6. Estructura química del sunitinib (a) y semaxanib (b) donde se remarca el farmacóforo de isatina en azul.	55
Figura 7. Estructura química del indol-3-carbinol.	56
Figura 8. Estructura química de la p-toluensulfonamida (a) y del indisulam (b) donde se remarca al farmacóforo de sulfonamida en azul.....	58
Figura 9. Estructura química general de la 3-(p-sulfonilaminofenilhidrazinil) isatina (izquierda) y de su derivado bromado en la posición 5 (derecha), ambos sintetizados por Bramson et al. en 2001.	59
Figura 10. Estructura química del derivado 45SN sintetizado por David et al. en 2001.	61
Figura 11. Estructura química de los derivados HBIa y HBIb patentados por Hassan et al. en 2012.....	62
Figura 12. Estructura química del derivado BIS sintetizado por Liang et al. en 2014.	63

Figura 13. Estructura química de los derivados IMIa e IMIb sintetizados por Eldehna et al. en 2018.....	64
Figura 14. Interfaz de la herramienta SwissTargetPrediction del Instituto Suizo de Bioinformática. Con esta herramienta se llevó a cabo la predicción de dianas moleculares de los híbridos de isatina diseñados.	77
Figura 15. a) Interfaz del software Avogadro utilizado para la creación de las estructuras 3D de los híbridos de isatina. b) Interfaz del software PyMOL utilizado en la visualización y edición de proteínas.	79
Figura 16. Interfaz del software AutoDockTools.....	81
Figura 17. Interfaz del software UCSF Chimera.....	82
Figura 18. Relación entre la distancia de dos partículas (Å) que interactúan por fuerzas de Van der Waals (negro), puentes de hidrógeno (rojo) o enlaces iónicos (azul) y la energía liberada por esta interacción (kJ/mol).	83
Figura 19. Interfaz del software LigPlot+.....	84
Figura 20. Interfaz de la herramienta SwissADME del Instituto Suizo de Bioinformática.....	85
Figura 21. Estructura en 2D y 3D de la isatina (izquierda) e indol-3-carbinol (derecha) donde se remarcan las diferencias estructurales en azul y rojo, respectivamente.....	99
Figura 22. Se encierran en púrpura los pares de electrones que actúan como aceptores para formar puentes de hidrógeno. En verde se encierran los hidrógenos que actúan como donadores para formar puentes de hidrógeno. a) Se remarcan las distancias de enlace del radical hidroximetilo (rojo). b) Se remarcan las distancias de enlace de la hidrazona. Además, se puede observar el bioisosterismo de la hidrazona con respecto al grupo ceto de la isatina.	101
Figura 23. Estructuras químicas de los híbridos isatina-indol-3-carbinol.....	103
Figura 24. Estructura química de los híbridos de isatina-p-toluensulfonamida...	104
Figura 25. Estructura química del híbrido bis-isatina.....	105

Figura 26. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-01 con la proteína cinasa HER2.	114
Figura 27. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-05 con la proteína cinasa CDK2.	115
Figura 28. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-09 con la proteína cinasa CDK2.	116
Figura 29. Diagrama de huevo hervido de los híbridos de isatina.	119
Figura 30. Apariencia macroscópica del transcurso de la reacción de formación de iminas para la síntesis del compuesto B-01.	123
Figura 31. Apariencia macroscópica del final de la reacción de formación de iminas para la síntesis del compuesto B-09.	124
Figura 32. Imágenes del proceso de purificación de los híbridos de isatina.	127
Figura 33. Aspecto macroscópico de los híbridos de isatina B-01, B-02 y B-06 (de izquierda a derecha) obtenidos por recristalización.	128
Figura 34. Aspecto macroscópico de los híbridos de isatina obtenidos por recristalización.	128
Figura 35. Espectro de RMN- ¹ H de B-01 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal.	139
Figura 36. Espectro de RMN- ¹³ C de B-01 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal.	142
Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H de B-05 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración, y constantes de acoplamiento de cada señal.	147
Figura 38. Espectro de RMN- ¹³ C de B-05 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal.	149

Figura 39. Espectro de RMN- ¹ H de B-09 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal.	151
Figura 40. Espectro de RMN- ¹³ C de B-09 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal.	153
Figura 41. Evaluación general de los híbridos de isatina en la línea celular MCF-7. * <i>P</i> <0.05	158
Figura 42. Determinación del IC ₅₀ de B-09 y lapatinib en la línea celular MCF-7.	159
Figura 43. Evaluación general de los híbridos de isatina en la línea celular PC-3.	160
Figura 44. Determinación del IC ₅₀ de B-09 en la línea celular PC-3.....	161
Figura 45. Evaluación general de los híbridos de isatina en la línea celular VERO.	163
Figura 46. Determinación del IC ₅₀ de B-09 en la línea celular VERO.....	164
Figura 47. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-02 con la proteína cinasa GSK3β.	172
Figura 48. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-03 con la proteína cinasa GSK3β.	173
Figura 49. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-04 con la proteína cinasa CDK1.	173
Figura 50. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-06 con la proteína cinasa CDK2.	174
Figura 51. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-07 con la proteína cinasa CDK2.	174
Figura 52. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-08 con la proteína cinasa CDK2.	175

Figura 53. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) del 2-oxoindol con la proteína cinasa HER2.	175
Figura 54. Espectro de RMN- ¹ H de B-02 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. Es importante observar que cada señal integra para dos protones debido a la simetría de la molécula. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO-d ₆ como solvente.	176
Figura 55. Espectro de RMN- ¹³ C de B-02 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO-d ₆ como solvente.	177
Figura 56. Espectro de RMN- ¹ H de B-06 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. Es importante observar que cada señal integra para dos protones debido a la simetría de la molécula. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO-d ₆ como solvente.	178
Figura 57. Espectro de RMN- ¹³ C de B-06 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO-d ₆ como solvente.	179
Figura 58. Espectro de RMN- ¹ H de B-08 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. Es importante observar que cada señal integra para dos protones debido a la simetría de la molécula. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO-d ₆ como solvente.	180
Figura 59. Espectro de RMN- ¹³ C de B-08 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO-d ₆ como solvente.	181

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reacción de formación de iminas utilizada para la síntesis de los híbridos de isatina.	86
Esquema 2. Reacción de formación de iminas optimizada para la síntesis de los híbridos de isatina.	125

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
Å	Angstroms
5-FU	5-Fluorouracilo
ACC	Acetil-CoA Carboxilasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ala	Alanina
AMP	Monofosfato de Adenosina
AMPK	Proteína Cinasa Activada por AMP
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
Asp	Aspartato
ATP	Trifosfato de Adenosina
BBB	Barrera hematoencefálica
CDC	Centro para el Control de Enfermedades
CDK	Cinasa Dependiente de Ciclina
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
Chk	Serina/Treonina Cinasa Chk
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSC	Célula Madre Cancerosa
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido Deuterado
DPF	Fibroblastos Diploides Humanos
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de Adsorción
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
EMEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
EMT	Transición Epitelial Mesenquimal
ER	Receptor de Estrógeno
ERK	Cinasa Reguladora de Señales Extracelulares
EtOH	Etanol
FADD	Dominio de Muerto Asociado a Fas
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GAPDH	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
Gln	Glutamina
GLOBOCAN	Observatorio Global del Cáncer
Glu	Glutamato
GLUT	Transportador de Glucosa
Gly	Glicina
GSK-3β	Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Beta
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HIA	Absorción Intestinal Humana

HIF	Factor Inducible de Hipoxia
His	Histidina
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
Hz	Hertz
kcal	Kilocaloría
I3C	Indol-3-carbinol
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
IGF	Factor de Crecimiento Insulínico
IL-6	Interleucina 6
Ile	Isoleucina
IMCO	Instituto Mexicano para la Competitividad
Leu	Leucina
Log P	Coeficiente de Reparto Octanol-Agua
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógeno
MCL1	Proteína de Diferenciación Celular de Leucemia Mieloide Inducida Mcl1
MeOH	Metanol
Met	Metionina
MET	Transición Mesenquimal Epitelial
MET	Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
MMP	Metaloproteinasa de Matriz
mTORC1	Complejo 1 de la Diana Mecanística de Rapamicina
NADPH	Dinucleótido de Nicotamida y Adenina Fosfato
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NK	Natural Killer o Citolítico Natural
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
PBS	Buffer de fosfato salino
PDGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PGP	Glucoproteína P
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes Por Millón
Rb	Retinoblastoma
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones Por Minuto
RPMI-1640	Medio Rosewell Park Memorial Institute 1640
SDF1	Factor Derivado de Células Estromales 1

Ser	Serina
Shh	Sonic Hedgehog
SIB	Instituto Suizo de Bioinformática
SREBP1c	Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a Esteroles 1c
TCR	Receptor de Célula T
TERT	Telomerasa Transcriptasa Inversa
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TLC	Cromatografía en Capa Fina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Tyr	Tirosina
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
UV	Ultravioleta
Val	Valina
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
Vis	Visible
WST1	4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 ¿Qué es el cáncer?

El cáncer se puede definir como un conjunto de patologías caracterizadas por un crecimiento celular descontrolado en un tejido específico que lleva a la formación de un tumor¹. No todos los tumores son cancerígenos. Dos características deben estar presentes en el tumor para poder considerarlo cáncer: 1) invasión de las células tumorales a tejidos circundantes y 2) capacidad de metástasis para invadir tejidos distantes.¹

La etiología exacta del cáncer aún sigue siendo desconocida, sin embargo, se sabe que es la suma de factores genéticos y epigenéticos los que contribuyen a su aparición. Y debido a que los factores epigenéticos pueden modificarse de acuerdo con el estilo de vida del individuo (por ejemplo, dieta, tabaquismo, microbiota, etc.), el cáncer se considera una enfermedad multifactorial, ya que su desarrollo es el resultado de la interacción de todos estos componentes con la carga genética de cada individuo.²

Es innegable que, con respecto a los últimos años, el conocimiento de la biología celular y molecular del cáncer ha crecido enormemente. Sin embargo, el hecho de que aún no se entienda por completo el proceso de carcinogénesis marca una

limitante en la prevención y la terapéutica de la enfermedad, la cual se ve reflejada en las cifras de incidencia y mortalidad.

1.2 Epidemiología del cáncer

1.2.1 Morbimortalidad del cáncer: un problema de salud pública

Hoy en día se considera al cáncer un problema de salud pública creciente tanto a nivel mundial como nacional, colocándose como la segunda y tercera causa de muerte, respectivamente. Tan solo en 2018, se reportaron 18 millones de casos nuevos y 9.5 millones de defunciones en todo el mundo. Por otro lado, en México se reportaron 190 mil casos nuevos y 83 mil defunciones ese mismo año. A pesar de estas cifras negativas se ha logrado un desarrollo importante en el manejo y atención del cáncer en el sector salud.³ Se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas, se han implementado programas de detección temprana, y se han desarrollado terapias más eficaces que han aumentado la supervivencia y disminuido la mortalidad de los pacientes con cáncer. Lamentablemente, los esfuerzos centrados en la prevención han fallado, generando en la población un estilo de vida que, sumado al factor genético, predispone a la carcinogénesis. De seguir así, la incidencia y mortalidad del cáncer aumentará en los próximos años.³

De acuerdo con GLOBOCAN, se estima que para los años 2030 y 2040 la incidencia del cáncer rondará los 24 y 29 millones de casos nuevos en el mundo, respectivamente. Estas cifras también se pueden visualizar como incrementos en la

incidencia actual a nivel mundial en un 33% y 61% para los años 2030 y 2040, respectivamente. De la misma manera, se estima que la mortalidad a nivel mundial aumentará en un 36% y 71% en los años 2030 y 2040. En lo que respecta al futuro del cáncer en México, se estima que la incidencia aumentará en un 44% y 89% en los años 2030 y 2040. La mortalidad, por otro lado, tendrá un incremento del 51% y 107% en los años 2030 y 2040.⁴

1.2.2 Los tipos de cáncer más comunes en México y el mundo

Como se mencionó anteriormente, el cáncer es un conjunto de patologías con características en común que difieren en el sitio anatómico afectado. De tal manera que las neoplasias pueden surgir en los pulmones, en el páncreas, en el hígado, en el cerebro, etc. Además, la neoplasia puede surgir en diferentes tejidos de un mismo órgano. Si el tumor se origina a partir del linaje epitelial, la neoplasia pasa a denominarse carcinoma. De acuerdo con las estadísticas, los carcinomas son los tumores de mayor incidencia en el mundo con una frecuencia de 85 por cada 100 casos. Si el tumor se origina a partir del linaje mesenquimal, la neoplasia pasa a denominarse sarcoma. Si el tumor se origina a partir de los tejidos del sistema linfático, la neoplasia pasa a denominarse linfoma. En conjunto, los carcinomas, sarcomas y linfomas se clasifican como tumores sólidos. Existe otro tipo de neoplasia que surge en los tejidos mieloides, o formadores de sangre, las leucemias. Este último tipo pertenece a la clasificación de los tumores líquidos.

Una vez revisada esta clasificación anatómico-histológica de los tumores podemos continuar analizando las estadísticas que describen la incidencia y mortalidad del cáncer de acuerdo con su sitio de origen.

De acuerdo con GLOBOCAN los seis tipos de cáncer con mayor incidencia en el mundo en 2018 fueron aquellos originados en el pulmón, mama, colon y recto, próstata, estómago e hígado. En conjunto, los tumores de estos sitios anatómicos representaron el 51% de los casos de cáncer a nivel mundial reportados ese mismo año. De manera similar, los seis tipos de cáncer con mayores índices de mortalidad en el mundo en 2018 fueron aquellos originados en el pulmón, colon y recto, estómago, hígado, mama y esófago (véase la figura 1-2).³

En México, los seis tumores de mayor frecuencia de aparición en 2018 fueron los que se originaron en las mamas, próstata, colon y recto, tiroides, cuerpo uterino y pulmón. Al igual que las estadísticas mundiales, las neoplasias de estos órganos representaron casi 50% de los casos de cáncer en el país. En lo que respecta a la mortalidad, los tipos de tumores con las cifras más elevadas ese mismo año fueron los de colon y recto, próstata, mama, hígado, pulmón y estómago (véase la figura 3-4).³

Esta tendencia en cuanto a incidencia y mortalidad que se mantiene en casi todos los países industrializados se debe en parte al estilo de vida occidental. Las dietas hipercalóricas ricas en grasas saturadas y carbohidratos simples, el sedentarismo y los hábitos recreativos tóxicos como tabaquismo y alcoholismo de occidente impactan de manera negativa en el desarrollo de cáncer. De hecho, se estima que la contribución de los factores ambientales, es decir, el estilo de vida de los sujetos

y el ambiente al que están expuestos contribuyen entre un 90 – 95% a la aparición de cáncer, mientras que la carga genética contribuye solo con un 5 – 10%. De este 90 – 95%, se desglosan diversos factores ambientales. Entre estos factores se destacan la dieta que contribuye con un 30 – 35%; el tabaquismo que contribuye con un 25 – 30%, las infecciones crónicas que contribuyen con un 15 -20%; la obesidad que contribuye con un 10 – 20%; y el alcoholismo que contribuye con un 4 – 6%. Todos estos porcentajes correspondientes a la contribución de los factores ambientales.⁵

La obesidad, una condición endocrino-metabólica anómala, ocasionada (generalmente) por un desequilibrio entre los mecanismos reguladores del hambre y la saciedad, el consumo de dietas hipercalóricas y el sedentarismo, se ha propagado por el mundo como una epidemia en las últimas décadas, especialmente en los países industrializados. El incremento en la incidencia del sobrepeso y la obesidad tiene una relación directa con el aumento en la incidencia de cáncer. De hecho, según estimaciones del Centro para el Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) se puede atribuir al sobrepeso y la obesidad, el 55% y 24% de los casos de cáncer diagnosticados en hombres y mujeres, respectivamente.⁶

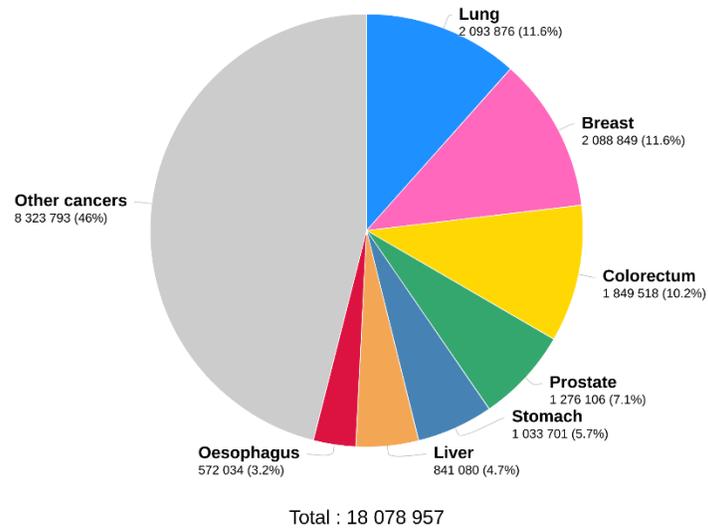


Figura 1. Incidencia por tipo de cáncer a nivel mundial en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.

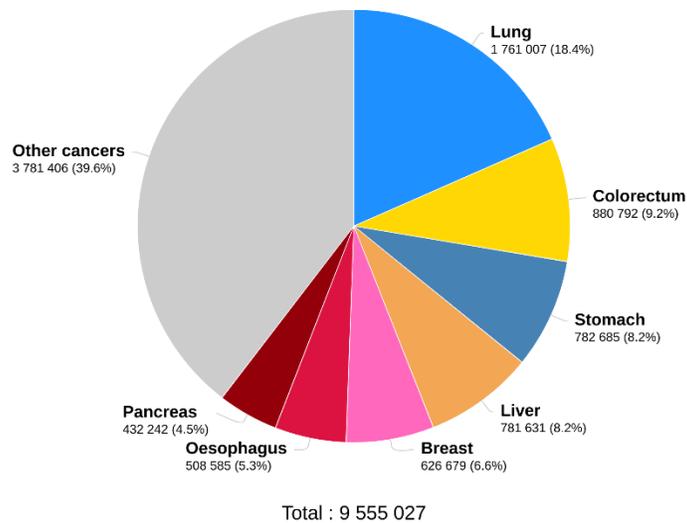


Figura 2. Mortalidad por tipo de cáncer a nivel mundial en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.

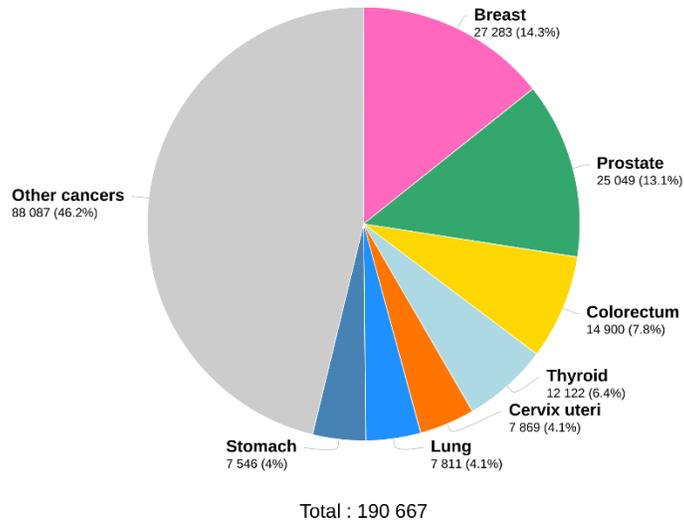


Figura 3. Incidencia por tipo de cáncer a nivel nacional en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.

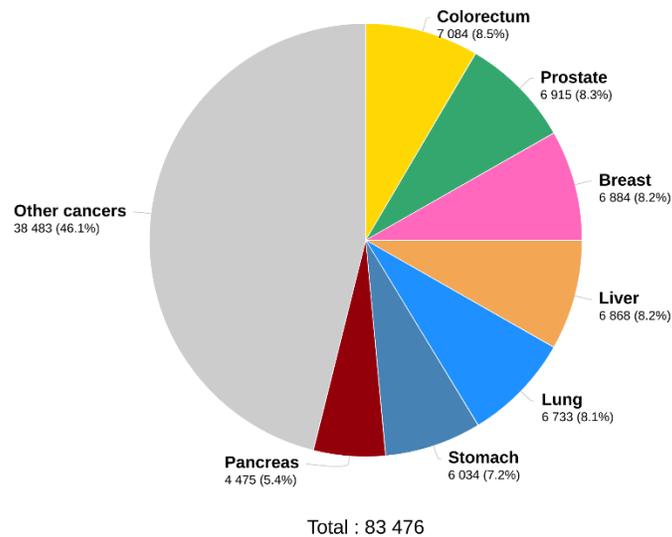


Figura 4. Mortalidad por tipo de cáncer a nivel nacional en 2018 (ambos sexos y todas las edades). Imagen obtenida de Globocan 2018. © International Agency for Research on Cancer.

1.2.3 Cáncer, más que un problema de salud

Además del impacto en la salud de los individuos afectados, el cáncer afecta la economía de estos, teniendo que desembolsar grandes cantidades de dinero para costear un tratamiento. En México, según el Instituto Mexicano para la Competitividad (IMCO), los precios por un tratamiento de cáncer de mama o leucemia pueden llegar hasta los \$245 mil o \$875 mil pesos mexicanos al año, respectivamente en individuos que no poseen seguro de gastos médicos mayores.⁷ Además, existe otro tipo de pérdidas económicas indirectas que los pacientes tienen que afrontar y muchos estudios pasan por alto, tal es el caso de las pérdidas relacionadas al trabajo de los individuos. Casi el 50% de la población con cáncer a nivel mundial se encuentra en un rango de edad de entre 18 – 65 años. Dentro de este rango de edad suelen caer la mayoría de los trabajadores, al menos en México. Debido a esto se puede dar una pérdida de productividad, aumentar el número de días en ausencia, o llegar a desarrollar una discapacidad.⁸

Todos estos factores impactan directamente al tratamiento terapéutico de los pacientes. Según diversos estudios existe una asociación directa entre los problemas económicos con deudas médicas, bancarrota, abandono o retraso de la atención médica, etc. A su vez esto resulta en una poca adherencia a la terapia contra el cáncer, lo que conlleva a la recurrencia, resistencia farmacológica, y una menor supervivencia para el paciente.⁸

Por otro lado, las elevadas cifras de dinero no solo afectan a los pacientes con cáncer, si no al país en general, que tiene que establecer políticas y programas de

salud para atender a su población. Tan solo en Estados Unidos los gastos nacionales dedicados a la atención del cáncer en 2017 fueron de \$147.3 billones de dólares. En México la situación no es diferente, según el IMCO las pérdidas económicas por pagos al sector salud para la atención del cáncer en los individuos rondan los \$395 millones de pesos y \$1870 millones de pesos para cáncer de mama y leucemias, respectivamente.⁹

Algunos autores también han evaluado el impacto social que tiene el cáncer en los familiares cercanos de los individuos afectados. En un estudio reciente se demostró que, de manera indirecta, los conyugues de los pacientes también experimentan dificultades para realizar actividades cotidianas básicas relacionadas a su trabajo y a las relaciones sociales.¹⁰

En definitiva, podemos observar que el cáncer es más que un problema salud. Si no se da un manejo adecuado de la enfermedad en la población, las consecuencias pueden llegar a impactar en el aspecto socioeconómico de un país. Por ende, entender la enfermedad y a partir de este conocimiento desarrollar mejores terapias es una tarea esencial de las ciencias biomédicas.

1.3. Biología celular y molecular del cáncer

Como Rudolf Virchow declaró en su tiempo, todas las enfermedades involucran cambios en las células normales, es decir, finalmente todas las patologías inician en la célula. De esta manera, primero necesitamos entender a nivel celular y molecular los procesos que llevan a las células normales a convertirse en células

tumorales y, posteriormente, entender los procesos celulares y moleculares en este estado. De esta forma podemos ser capaces de plantear nuevas estrategias preventivas y terapéuticas. Lamentablemente, no podemos llevar a cabo este enfoque en dicho orden debido a que aún no hay certeza del proceso de carcinogénesis. Primero, describiremos la biología celular y molecular del cáncer, y posteriormente, discutiremos los factores y mecanismos involucrados en la carcinogénesis según las teorías más recientes.¹¹

Todo el comportamiento de las neoplasias malignas puede ser descrito en base a diez principios fundamentales. Estos principios acuñados como las “características del cáncer” (o Hallmarks of Cancer, en inglés) describen los procesos celulares a través de los cuales un tumor crece, sobrevive, invade y lleva a cabo la metástasis en el organismo. A continuación, se enumeran las diez características del cáncer y se describe brevemente cada una de ellas:

1.3.1 Señalización proliferativa sostenida

Las células normales solo proliferan cuando en su ambiente extracelular existen factores de crecimiento que promuevan este proceso. Las células son capaces de reconocer estas proteínas mediante receptores de membrana. Cuando un factor de crecimiento se une a su respectivo receptor, una vía de transducción inicia en la célula de manera tal que esta altere los perfiles metabólicos y de expresión génica necesarios para iniciar el ciclo celular. Algunos factores de crecimiento permanecen

secuestrados en la matriz extracelular, de tal modo que, remodelar el ambiente de la célula puede conducir a la liberación de estos y posteriormente a la proliferación.

En el caso de las células tumorales, la proliferación celular se puede mantener activa a través de diferentes mecanismos. El primero de ellos es el aumento en la secreción de factores de crecimiento, y de los receptores correspondientes por parte de las células tumorales. De esta manera la célula puede iniciar el ciclo celular a través de una señalización autocrina. Sin embargo, las células tumorales también tienen la capacidad de inducir en las células adyacentes la síntesis y secreción de señales de crecimiento.^{12,13} El segundo de estos mecanismos consiste en aumentar la cantidad de receptores de factores de crecimiento en su membrana celular, de tal manera que la célula disminuya el umbral de concentración necesario para iniciar las vías de señalización que conllevan a la división celular. En estas circunstancias, la célula tumoral sería capaz de volverse altamente responsiva a la más mínima concentración de factores de crecimiento presentes en el medio. En el tercero de estos mecanismos, la célula puede sintetizar y localizar receptores de factores de crecimiento estructuralmente alterados que se activen aun en ausencia del ligando.¹⁴⁻¹⁶ Además, las células tumorales usualmente afectan la expresión génica de proteínas reguladoras de vías de señalización.¹⁷

1.3.2 Evasión de los supresores del crecimiento

Para poder mantener una proliferación sostenida como la que se describió en el punto anterior, la célula debe ser capaz de evadir con éxito las proteínas

reguladoras y supresoras del ciclo celular. Las dos proteínas reguladoras del ciclo celular más estudiadas son p53 y Rb. Estas moléculas tienen la capacidad de integrar señales extracelulares e intracelulares, y en base a estas, dirigir la respuesta celular hacia la proliferación, la senescencia, la reparación o incluso la apoptosis. Se ha demostrado que la ausencia o el silenciamiento de alguna de ellas es suficiente para inducir tumores en los modelos murinos.

En algunos tumores humanos se han identificado células que presentan versiones alteradas de la proteína p53, de tal manera que su funcionamiento no es el óptimo o incluso llega a ser nulo. Además, se ha llegado a demostrar que algunos tumores resistentes a la muerte celular inducida por la quimioterapia suelen llegar a presentar una expresión de p53 disminuida.¹⁸⁻²⁰

Otro mecanismo de represión de la proliferación que las células tumorales deben superar para desarrollarse es la inhibición por contacto. La inhibición por contacto es un mecanismo poco entendido en términos de la biología celular y molecular.²¹ Este, básicamente, les impide a las células seguir proliferando cuando se encuentran completamente interaccionando a su alrededor con otras células. En el caso del cáncer, este mecanismo se ve superado, y prueba de ello es la formación de tumores, que son enormes masas de células con una arquitectura tisular aberrante.¹⁷

1.3.3 Evasión de la destrucción por el sistema inmune

Desde que se descubrió que células del sistema inmune infiltraban los tumores, los científicos propusieron que este comportamiento se debía a un rol protector que ejercían estas células. Desde entonces se ha avanzado enormemente en el campo de la inmunología de los tumores llegando a identificar tres tipos de células que cumplen con este papel: los linfocitos CD8+, los linfocitos CD4+ Th1 y las células NK.

Los linfocitos CD4+ y CD8+ son células T que expresan un receptor de antígeno específico. Cada célula T solo puede ser estimulada por un antígeno en particular, y luego de esto, proliferan para generar múltiples copias idénticas o clonas que expresen el mismo receptor. Las células CD4+ son las células T más versátiles del sistema inmune y se le considera como las líderes del ataque ya que dependiendo del agente patógeno montan la respuesta más adecuada. Esta versatilidad la podemos apreciar en los diferentes subtipos en los que se pueden especializar, entre estos tenemos al subtipo Th1 que se encargan de agentes intracelulares, al subtipo Th2 que se encarga de los helmintos, y al subtipo Th17 que se encarga de agentes extracelulares, principalmente.²²

En el caso del cáncer, el subtipo que nos interesa de las células CD4+ es el Th1 capaz de secretar citocinas activadoras de la respuesta inmune intracelular. Los linfocitos T CD8+ que se activan de esta forma pueden entonces utilizar su sistema de destrucción basado en perforina/granzima para destruir células tumorales. El principal problema que las células CD4+ y CD8+ enfrentan en el cáncer es la

dificultad para activarse en un inicio. Estas células necesitan estimulación directa de un receptor de membrana conocido como “Receptor de Célula T” o TCR (por sus siglas en inglés). El TCR responde a diferentes antígenos colocados en un receptor de membrana denominado “Antígeno Leucocitario Humano” (o HLA por sus siglas en inglés) para su activación. Sin embargo, debido a que las células tumorales guardan una estrecha similitud con las células normales, la estimulación antigénica no se da con eficacia. De hecho, algunas células cancerosas, como parte de la progresión tumoral, disminuyen su expresión de HLA, para evitar despertar respuesta inmune.²²

Las células NK pueden inducir apoptosis en las células tumorales a través de un mecanismo inverso. En lugar de identificar anomalías a través de la interacción con el HLA de las células cancerosas, estas identifican la presencia o no de dicho receptor. Como se mencionó antes, conforme el tumor progresa, las células tumorales suelen disminuir la expresión de tal receptor. De esta manera, las células NK pueden identificar células tumorales y destruirlas. Sin embargo, la secreción de citocinas inmunosupresoras como TGF- β por otra población de células del sistema inmune, como los linfocitos T reguladores, inactiva a las células NK.²³ De esta manera, el tumor puede evadir su destrucción por el sistema inmune.¹⁷

1.3.4 Activación de la inmortalidad replicativa

Se sabe, de acuerdo con estudios *in vitro*, que las células normales no pueden proliferar eternamente, sino que se replican un cierto número de ciclos hasta

alcanzar un límite. Este límite lo establecen los telómeros, los extremos físicos del material genético en los cromosomas. Los telómeros son secuencias largas de pares de bases que repiten una unidad básica de 6 nucleótidos. Conforme una célula atraviesa el ciclo celular, esta secuencia se va acortando hasta desaparecer. La presencia de telómeros en el material genético es importante, porque de no estar presentes, la célula sería más susceptible a sufrir daños en el ADN. Uno de estos daños es la formación de puentes extremo-extremo entre moléculas de ADN que han perdido sus telómeros, generando cromosomas bicentricos, y posteriormente, deleciones y amplificaciones luego de la segregación cromosómica durante la mitosis.

Por este motivo, se dice que los telómeros son el reloj biológico de la célula, ya que su potencial para atravesar el ciclo celular está delimitado por los telómeros. Una vez se alcanza este límite, la célula inicia un programa conocido como “senescencia” en el que esta se mantiene viable pero no puede acceder al ciclo celular. Algunas células que logran evitar la senescencia entran en un estado denominado “crisis” en el que suelen morir. Se piensa que la senescencia es un estado de protección contra el desarrollo de tumores, según algunos modelos murinos.^{17,24}

Para formar la masa de células de la que se compone un tumor, el límite replicativo que establecen los telómeros debe superarse. De otra manera, las células no podrán proliferar indefinidamente. Con el objetivo de superar este obstáculo, la célula cancerosa altera su perfil de expresión génica, regulando al alza la expresión

de la telomerasa y liberando su potencial replicativo. En este punto se dice que la célula se volvió inmortalizada.^{17,24}

La telomerasa es una enzima capaz de catalizar la formación de telómeros utilizando su actividad de transcriptasa inversa y un molde de ARN que forma parte de su estructura. En las células no inmortalizadas (es decir, las células de los tejidos normales) la telomerasa tiene una poca o nula expresión. Sin embargo, la telomerasa esta expresada en la gran mayoría (aproximadamente el 90%) de las células inmortalizadas.¹⁷

1.3.5 Inflamación promotora de tumores

Los tumores son masas de células heterogéneas que presentan una organización similar a la de los tejidos normales. De estos conjuntos de células podemos destacar una población en particular implicada directamente en el origen y progresión de los tumores. Esta población de células son las del sistema inmune.

Anteriormente se pensaba que la presencia de células del sistema inmune en los tumores tenía rol principalmente protector. De tal manera, que este se encargaba de inducir apoptosis en las células tumorales y limpiar sus restos. Sin embargo, esta afirmación no podía estar más equivocada, pues hoy en día se reconoce al sistema inmune como un jugador principal en el inicio y progresión tumoral. Por medio de las citocinas inflamatorias que los macrófagos y neutrófilos pueden liberar se puede llegar a inducir la activación de los programas de proliferación, supervivencia y metástasis en los tumores. Se ha reportado mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*

la inducción del programa de “transición epitelial mesenquimal” (EMT, por sus siglas en inglés) en células cancerosas que se exponen a IL-6 y TGF- β .²⁵⁻²⁷ Además, los leucocitos también tienen la capacidad de secretar enzimas remodeladoras de la matriz extracelular, liberando los factores de crecimiento retenidos ahí y facilitando de esta manera el escape de las células mesenquimales.²⁸ La presencia de células del sistema inmune también se ha asociado con la angiogénesis, debido a que algunos leucocitos pueden llegar a secretar los factores solubles necesarios para este proceso. Por último, debido a que en ambientes altamente inflamatorios el principal modo de ataque del sistema inmune es la liberación de especies reactivas de oxígeno o ROS (por sus siglas en inglés), la inestabilidad genética de los tumores también se explica a través del sistema inmune, ya que las ROS suelen ser excelentes agentes mutágenos.¹⁷

1.3.6 Activación de la invasión y metástasis

El peor pronóstico para un individuo con cáncer es la presencia de invasión y metástasis. En esta etapa de la patogenia del cáncer, las células migran desde el tumor primario hacia diferentes órganos con el objetivo de colonizarlos y desarrollar segundas neoplasias.

La invasión y la metástasis son los procesos más importantes a la hora de estudiar el cáncer. De hecho, son estos procesos las características distintivas que se toman en cuenta para que un tumor sea considerado maligno y, por ende, cáncer.

De manera normal en los tejidos una célula se encuentra unida a células vecinas y la matriz extracelular por medio de moléculas de adhesión. Existen diversos tipos de estas moléculas, sin embargo, la más estudiada por su rol en el proceso de invasión es la E-cadherina. La E-cadherina es una proteína de membrana que forma uniones homofílicas con las moléculas de E-cadherina de las células vecinas. Esta molécula solo se expresa en células del linaje epitelial, de ahí la terminología “E” de su nombre. Debido a su capacidad para mantener a las células epiteliales unidas, se cree que la E-cadherina juega un rol clave contra el proceso de carcinogénesis.²⁵⁻²⁷

Conforme un tumor progresa hacia la metástasis, sus células comienzan a expresar una serie de factores de transcripción característicos del fenotipo mesenquimal, estos son Snai1, Slug, Twist y Zeb1/2. Estas proteínas inducen la expresión de genes del fenotipo mesenquimal como N-cadherina y vimentina, y a su vez disminuyen la expresión de los genes característicos del fenotipo epitelial, entre ellos la E-cadherina. La célula sufre una transdiferenciación, y pasa de un linaje epitelial a un linaje mesenquimal que no está retenido por las uniones célula-célula de las células epiteliales vecinas. Además, su forma también se ve alterada, dejando la morfología poligonal característica de las células epiteliales y adquiriendo una morfología larga y delgada característica del fibroblasto, una célula mesenquimal. Las células mesenquimales resultantes son móviles, y debido a que no están retenidas por las uniones célula-célula, estas pueden llegar a invadir tejidos circundantes, y a través de la vascularización de los tumores invadir tejidos distantes. Este programa de sucesos que desemboca en células aptas para la

invasión y metástasis es el ya mencionado EMT. En la característica 5 se discute uno de los factores intrínsecos del tumor que inician la EMT.²⁵⁻²⁷

Una vez que las células adquieren estas características mesenquimales pueden migrar a través de la sangre hacia diferentes órganos. Para poder llevar a cabo la colonización del órgano, la célula debe sufrir una transdiferenciación de nuevo, esta vez en el sentido inverso, la “transición mesenquimal-epitelial” o MET (por sus siglas en inglés). Esta transición inducida por el ambiente no inflamatorio y las células vecinas del órgano secundario permite a las células tumorales asentarse en el órgano. Sin embargo, debido a que el órgano secundario no es un ambiente propicio para el desarrollo tumoral, muchas de las células mueren o entran en un estado de inactividad regulado por diversos factores, uno de ellos siendo el tumor primario.¹⁷

1.3.7 Inducción de la angiogénesis

Los tumores, como los tejidos normales, se componen de células metabólicamente activas que necesitan nutrientes y oxígeno para llevar a cabo sus funciones. Además, como parte del metabolismo normal, también necesitan de un sistema eficiente para eliminar los residuos metabólicos. Como se describirá en la característica diez, los tumores se desvían de la normalidad en el metabolismo, acentuando aún más las necesidades de suministro y desecho mencionadas anteriormente.

Estas necesidades de los tejidos y los tumores se ven resueltas por los vasos sanguíneos que, a través de la sangre, se encargan del suministro constante de

nutrientes y oxígeno, y del retiro de residuos metabólicos del espacio extracelular. Los vasos sanguíneos de los tejidos se forman durante el proceso de morfogénesis a partir de progenitores endoteliales. Las células endoteliales recién formadas se ensamblan para formar los vasos, y la vascularización de los tejidos ocurre a través de ramificaciones de vasos sanguíneos ya existentes, este último proceso conocido como angiogénesis. Como los tumores son tejidos anormales que se desarrollaron luego de haber finalizado la morfogénesis, estos recaen en el proceso de angiogénesis para vascularizarse a partir de los vasos sanguíneos circulantes de los tejidos normales.¹⁷

Para iniciar el proceso de angiogénesis, las células tumorales y las células del estroma secretan al espacio extracelular factores solubles inductores de este proceso, siendo el más común el factor de crecimiento endotelial vascular A o VEGF-A (por sus siglas en inglés). El VEGF-A puede unirse a dos receptores diferentes VEGFR1 y VEGFR2, dependiendo de la célula diana. Todos estos receptores operan por un mecanismo de tirosín quinasas. El resultado global de la unión ligando-receptor es la ramificación de los vasos sanguíneos ya existentes hacia el tumor. Existen dos estímulos importantes que pueden llevar a la célula tumoral a secretar VEGF-A, el primero de ellos es la señalización celular aberrante que puede ocurrir como parte de la característica número uno; el segundo de ellos es la hipoxia generada en el centro del tumor conforme este se desarrolla. La hipoxia provoca la expresión del factor inducible de hipoxia 1 alfa, un factor de transcripción que regula al alza la síntesis y secreción de VEGF-A.^{17,29}

A pesar de la alta vascularización que los tumores pueden llegar a desarrollar, los vasos sanguíneos presentan anomalías estructurales y funcionales. Estos suelen estar distorsionados y agrandados, poseen una alta permeabilidad y por lo tanto permiten microhemorragias, y existen niveles erráticos de proliferación y apoptosis en las células endoteliales.¹⁷

1.3.8 Inestabilidad genómica y mutaciones

Bajo el modelo de la teoría de las mutaciones somáticas, las células de manera normal adquieren mutaciones con el paso del tiempo y con cada división celular que llevan a cabo. Las mutaciones pueden desembocar en ningún cambio estructural o funcional de las células en el mejor de los casos, sin embargo, si las mutaciones se dan en protooncogenes o genes supresores de tumor, la carcinogénesis comienza. Los oncogenes y los genes supresores de tumor suelen ser genes relacionados a los programas de proliferación, y genes relacionados a la detección y reparación del ADN y apoptosis, respectivamente. La célula con mutaciones en oncogenes comenzara a proliferar cada vez más sin control, llevando a la acumulación de más mutaciones en otros genes. La célula con mutaciones en genes supresores de tumor no llevará a cabo una correcta detección y reparación del ADN en cada ciclo de división celular lo que ocasionará la acumulación de más mutaciones en otros genes. Además, si existieran mutaciones en los genes que controlan el proceso de muerte celular, estas células defectuosas tendrían la capacidad de sobrevivir.^{30,31}

Lamentablemente, debido a esta teoría, el estudio del cáncer y el enfoque terapéutico que se le está dando, está fracasando. Las limitaciones de la teoría de las mutaciones somáticas se abordarán en la siguiente sección.¹⁷

1.3.9 Resistencia a la muerte celular

La muerte celular es un proceso normal dentro de los tejidos del organismo que permite el recambio de células viejas y dañadas por células nuevas a partir de células progenitoras. Por este motivo, la muerte celular en condiciones normales es un proceso altamente regulado que conduce a la destrucción paso a paso de las macromoléculas que componen a una célula, es decir, la degradación del ADN, proteínas y membranas lipídicas. Además, para evitar liberar su contenido al espacio extracelular luego de su muerte, las células forman pequeñas vesículas o “cuerpos apoptóticos” que resguardan los componentes celulares digeridos. Posteriormente, células fagocíticas especializadas como los macrófagos o incluso las células vecinas pueden captar estas vesículas y eliminar los restos celulares. Cuando la muerte celular se da de esta manera ordenada se conoce como apoptosis.³²

La apoptosis es un proceso altamente regulado que responde a diferentes estímulos para su activación. Se conocen dos vías principales por las cuales se inicia el proceso: la vía extrínseca iniciada por factores extracelulares, y la vía intrínseca por factores intracelulares. Además, cada camino se dirige por una familia de proteínas proteolíticas conocida como “la familia de las caspasas”. Las caspasas se pueden

dividir en dos tipos: caspasas iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras tienen la función de enlazar la transducción del estímulo iniciador con la activación de las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras, por otro lado, inician los procesos de degradación celular, y conducen a la formación de cuerpos apoptóticos.

La vía extrínseca usualmente se dispara por el sistema Fas/FasL de las células del sistema inmune en respuesta a infecciones intracelulares de virus o bacterias, y en células tumorales a las que el sistema inmune reconoce como extrañas. Este sistema se compone de un receptor de membrana en las células diana llamado Fas. El ligando que inicia el proceso de apoptosis en la célula diana se conoce como FasL y está presente en el leucocito. Luego de la interacción Fas-FasL a nivel molecular, el receptor sufre un cambio conformacional y recluta a la proteína adaptadora llamada dominio de muerte asociado a Fas o FADD (por sus siglas en inglés). FADD a su vez recluta al zimógeno inactivo procaspasa 8 que se dimeriza luego de esta interacción y se activa a caspasa 8 luego de una serie de escisiones proteicas. La caspasa 8 es una caspasa iniciadora, y luego de su activación escinde a la procaspasa 3 para convertirla a su forma activa caspasa 3, una caspasa efectora. Esto marca el inicio de la fase de degradación.³²

En el caso de la vía intrínseca, se ha reportado que las toxinas, la radiación, la hipoxia, las infecciones virales y las especies reactivas de oxígeno puede disparar el proceso. Todos estos agentes causales impactan la función mitocondrial, especialmente, la permeabilidad de la membrana interna que resguarda proteínas proapoptóticas, entre las que se encuentra el citocromo c. Al dañarse la membrana, el citocromo c sale al citoplasma donde se encuentra con las proteínas adaptadoras

Apaf-1. La interacción citocromo c-Apaf-1 genera un complejo proteico con actividad proteolítica denominado “apoptosoma” cuyo objetivo es escindir la procaspasa 9 a su forma activa. La caspasa 9 ya activa puede activar por escisión proteica a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 que inician el proceso de degradación celular.³²

El daño al ADN por diversos factores también puede ser un estímulo para iniciar la vía intrínseca. A través de diversas proteínas sensoras se monitorea el daño del ADN en diferentes puntos del ciclo celular de una célula. Si existiera daño en el ADN en un punto importante de su ciclo celular como, por ejemplo, la fase S o la fase M, la proteína reguladora p53 tiene la capacidad de llevar a la célula a dos destinos: arrestar el ciclo celular con el objetivo de reparar el ADN o iniciar la apoptosis. La elección de una decisión o la otra parece depender del grado de daño en el ADN que la célula adquirió.³²

A pesar de la existencia de un gran número de estímulos que pueden llevar al inicio de la apoptosis, la célula, de manera global, regula este proceso mediante la concentración relativa de las proteínas de la familia Bcl-2. Esta familia se compone de dos grupos, proteínas proapoptóticas como Bax y Bak, y proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL. Bax y Bak se localizan en la membrana mitocondrial externa y tienen la capacidad de alterar la permeabilidad mitocondrial. Bcl-2 y Bcl-xL interactúan con Bax y Bak a través de un dominio conocido como BH3, y a través de esta interacción su actividad se suprime.³²

Existe un tercer grupo de proteínas reguladoras de la apoptosis de la familia Bcl-2 conocido como proteínas solo BH3, debido a que solo presentan un dominio BH3 en su estructura. Estas proteínas tienen la capacidad de inhibir o activar proteínas

antiapoptóticas o proapoptóticas de manera directa, respectivamente. De hecho, la proteína p53 que se mencionó anteriormente induce un aumento en la expresión de Puma y Noxa, dos proteínas de este tipo, que inician la apoptosis luego de un elevado daño en el ADN.³²

Como se puede observar, la apoptosis es un proceso altamente regulado debido a que debe existir un equilibrio definido que favorezca la supervivencia de las células funcionales y la eliminación de las células anormales o viejas con el objetivo de asegurar el correcto funcionamiento de los órganos.

En el caso de las células tumorales este equilibrio se ve superado debido a que estas logran evadir la señalización que conduce a la muerte celular. Un mecanismo frecuente en los tumores para llevar este cometido es la eliminación de la proteína p53 ya sea por silenciamiento epigénético o por un daño en la estructura del gen que conduce a una proteína no funcional. De esta manera, las células tumorales que desarrollan una gran cantidad de defectos genéticos debido a las altas tasas de replicación/división pueden sobrevivir. Además, este mecanismo puede ser utilizado como una forma de resistencia a la terapia farmacológica en aquellas drogas cuyo objetivo es la inducción de la apoptosis. Otra manera común de evadir la apoptosis es la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, y la disminución en la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax o Puma. De esta manera, el equilibrio global siempre favorecerá la supervivencia.^{17,33}

1.3.10 Desregulación de la bioenergética celular

Para adaptarse a una alta síntesis de macromoléculas necesarias para la proliferación, las células tumorales alteran su metabolismo. Una célula normal, metaboliza la glucosa comenzando con la vía de la glucólisis y terminando en la fosforilación oxidativa. Este camino le permite a la célula extraer la mayor cantidad de energía química contenida en los enlaces de la glucosa.

En el caso de las células tumorales, la glucosa no atraviesa todo este camino, y su metabolismo se estanca en la glucólisis aun en presencia de oxígeno, este fenómeno se conoce como efecto Warburg, en honor a su descubridor. A pesar de lo contraproducente que esto pueda parecer, la célula cancerosa toma ventaja de esto de diferentes maneras. La célula tumoral necesita un aporte constante de aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas, y de carbohidratos para la síntesis de ácidos nucleicos, siendo estas dos macromoléculas las más importantes para llevar a cabo la división celular. Por lo tanto, al frenar el metabolismo de la glucosa en el glucólisis, la célula puede aprovechar los metabolitos e intermediarios de la vía para la síntesis de otras sustancias. El piruvato que se genera como producto final de la glucólisis se puede utilizar para la síntesis de L-alanina. La glucosa también puede entrar a la vía de las pentosas fosfato para generar ribosa y equivalentes de reducción (NADPH) necesarios para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. De manera global, la célula opta por utilizar los esqueletos carbonados de los intermediarios de la glucólisis y vías relacionadas, con el objetivo de sintetizar biomoléculas.³⁴

Para sobrellevar los impedimentos energéticos que se generan en la célula por esta decisión en su metabolismo, la célula sobreexpresa receptores de glucosa (GLUT1) para compensar la poca producción de ATP que la glucólisis representa. Además, dentro del tumor algunas células comienzan a orientar su metabolismo de tal manera que comienzan a producir lactato a partir del piruvato de la glucólisis, mientras que otras células se especializan para captar el lactato y utilizarlo como fuente de energía, un fenómeno similar a lo que ocurre en el músculo.³⁵

Por último, otro estímulo importante en este cambio metabólico de las células tumorales, que además tiene repercusiones en otras características del cáncer, es la hipoxia. Conforme un tumor aumenta en tamaño, las células que se encuentran distribuidas en la parte interna presentan una menor accesibilidad a los vasos sanguíneos de los tejidos circundantes. Esto genera una hipoxia en estas células, lo que conduce a la expresión del factor inducible de hipoxia 1 alfa (HIF1 α) y factor inducible de hipoxia 2 alfa (HIF2 α), que aumentan la expresión de genes relacionados con la glucólisis para que la célula altere su metabolismo. Además, estos factores de transcripción impactarán en la secreción de moléculas solubles iniciadoras de la angiogénesis.^{17,35}

1.4 La importancia del microambiente tumoral

Los tumores son masas de células heterogéneas que presentan una organización similar a la de un tejido. La visión tradicional de los tumores los describía como meras masas de células tumorales, sin embargo, actualmente se sabe que

presentan cierta organización y dependen de la participación de células accesorias para llevar a cabo todos sus procesos.¹⁷

De manera general, podemos mencionar tres componentes principales en los tumores³⁶:

- 1) Células cancerosas
- 2) Células del estroma: conformadas por células del sistema inmune, fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, pericitos, entre otras.
- 3) Matriz extracelular: conformada por colágeno, elastina, fibronectina, entre otras moléculas.

Estos componentes interaccionan entre ellos de manera directa e indirecta a través de la secreción de hormonas y otras moléculas de señalización. Esta comunicación tan estrecha ya la hemos descrito previamente en la sección pasada, pero es importante recalcar que, a pesar de que las células cancerosas son la población de células central en el tumor, sin las células del estroma los tumores no podrían iniciar ni progresar.^{17,36}

Las células del estroma son indispensables para los procesos de proliferación ya que tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento; son indispensables para el proceso de angiogénesis por la secreción de factores angiogénicos como VEGF y angiopoyetinas; son indispensables para el proceso de invasión por los efectos de remodelación que pueden ejercer sobre la matriz extracelular; son indispensables para la metástasis porque secretan los mediadores solubles necesarios para iniciar el programa EMT en las células cancerosas; son

indispensables para la evasión de la destrucción por el sistema inmune a través de la secreción de citocinas inmunosupresoras.^{17,36,37}

Por estos motivos, se ha planteado dirigir la terapéutica del cáncer no solo a las células cancerosas, sino también a las células del estroma. Un ejemplo de este enfoque es el empleo del Bevacizumab en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico, glioblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de células renales. El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal con alta afinidad por la proteína VEGF, al unirse a esta, evita su unión al receptor VEGFR, y de esta manera, interrumpe el proceso de angiogénesis.³⁷

Lamentablemente el uso de Bevacizumab como agente antiangiogénico no ha sido exitoso del todo, pues se han reportado diferentes mecanismos de resistencia farmacológica que los tumores montan luego de la terapia. Entre estos mecanismos se encuentran la mimetización de vasos sanguíneos por células cancerosas, la protección de los vasos sanguíneos mediante cubiertas de pericitos, la localización cercana a vasos sanguíneos existentes, la secreción de moléculas inductoras de angiogénesis diferentes del VEGF como la angiopoietina 1 y el factor derivado de células del estroma 1 (o SDF1 por sus siglas en inglés), y un incremento en la tasa de invasión y metástasis compensatorio, entre otros.³⁸

La resistencia farmacológica de los tumores actualmente sigue limitando la eficacia de los tratamientos disponibles para el cáncer. Se ha tratado de explicar el desarrollo de resistencia farmacológica a través de procesos Darwinianos, donde solo aquellas células más aptas y capaces de sobrevivir (por las mutaciones adquiridas), permanecen y podrán repoblar el tumor, ahora resistente a la terapia,

sin embargo, esto no es del todo cierto. Se han reportado mecanismos de resistencia de carácter epigénético que se generan solo de manera temporal e incluso llegan a ser reversibles luego de retirar la terapia.

El desarrollo de resistencia farmacológica por el tumor es un proceso controlado, en cierta medida, por el estroma de este. Todas las células del estroma acondicionan al tumor a ciertas características físicas y químicas necesarias para el desarrollo y mantenimiento de una población de células cancerosas especial, las células madre cancerosas (o CSC por sus siglas en inglés). Como se verá en la siguiente sección, esta población de células juega un rol clave en el inicio, progresión, metástasis, y resistencia del tumor.

1.5 Células madre cancerosas

1.5.1 Células madre

Los órganos están compuestos de diferentes tejidos, entre estos se encuentran el epitelial, conectivo, muscular y nervioso. A través de la interacción de estos tejidos un órgano desempeña sus funciones esenciales. Cuando un órgano se daña, las células adyacentes al sitio de la lesión tienen la capacidad de activar el ciclo celular con el objetivo de proliferar y repoblar el órgano dañado. A pesar de ser el mecanismo de reparación inmediato de los tejidos, estas células tienen la limitación de no poder proliferar y reparar el tejido de manera indefinida, ya que, en algún punto, alcanzarán la senescencia replicativa que induce el acortamiento de

telómeros. De ser este el único mecanismo de reparación y remodelación de órganos, estos alcanzarían la falla orgánica en un período de tiempo corto.

Para sobrepasar esta capacidad proliferativa limitada que tienen las células con diferenciación terminal, dentro de los tejidos existe una población de células con capacidad replicativa casi ilimitada, estas son las células madre adultas. Las células madre adultas son una población de células relativamente escasa de los tejidos, estas se distinguen por dos características principales: tienen la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse. A continuación, describiremos brevemente estas características.

Las células madre adultas (o simplemente células madre) son las células progenitoras de los tejidos. En circunstancias de daño tisular o de remodelación de un órgano, las células madre reciben estímulos de su ambiente extracelular para inducir las a entrar en un proceso conocido como diferenciación. La diferenciación no es más que la especialización de una célula madre a una célula con una función específica en un órgano en particular. Cuando la célula madre se ha diferenciado hasta una célula especializada como, por ejemplo, una célula epitelial, se dice que esta ha alcanzado la diferenciación terminal. Durante este proceso la célula madre altera sus perfiles de expresión génica hasta adoptar el fenotipo final. Existe evidencia de que el proceso inverso, es decir, el proceso en el que una célula especializada adopta un fenotipo de célula madre, también es posible. Este proceso se denomina desdiferenciación.³⁹

Las células madre expresan telomerasa, por este motivo, su capacidad proliferativa es casi ilimitada, ya que el acortamiento de telómeros que ocurre en cada división

será mínimo en comparación con una célula que ha alcanzado la diferenciación terminal.⁴⁰

Integrando estas dos características una célula madre es capaz de repoblar un órgano a través de su diferenciación en diferentes tipos celulares. Además, con el objetivo de mantener esta población de células, las células madre se someten a división asimétrica. En este tipo de división celular la célula progenitora se divide en dos células hijas diferentes, una que mantiene un fenotipo de célula madre, y otra que inicia el proceso de diferenciación.

Una célula madre de los tejidos adultos puede diferenciarse en diferentes fenotipos celulares con diferenciación terminal de un tejido en particular. A esta capacidad se le denomina multipotencia. Existen otros tipos de células madre que pueden diferenciarse en células de diferentes tejidos. A esta capacidad se le denomina pluripotencia.

1.5.2 Células madre cancerosas

Al igual que los órganos, los tumores también presentan una población de células tumorales con características de célula madre o troncalidad. Estas células se conocen como células madre cancerosas, y se les atribuye, según algunas teorías contemporáneas de la carcinogénesis, ser las células iniciadoras de los tumores.

Las células madre cancerosas (o CSC por sus siglas en inglés) son células cancerosas que han adquirido los rasgos de troncalidad y autorrenovación de las

células madre. De la misma manera que una célula madre puede proliferar y diferenciarse para repoblar un órgano, las CSC tienen la capacidad de proliferar y aumentar el número de células cancerosas en el tumor, aunque, de manera análoga a los órganos, estas últimas carecen de los rasgos de las CSC. Las células resultantes de este proceso suelen guardar similitudes fenotípicas a las células ya diferenciadas del órgano donde surgió el tumor, aunque su comportamiento es aberrante (como ya se describió previamente).³⁹

Como parte de las características de las CSC, estas pueden modificar su metabolismo y ciclo celular de tal manera que incluso dentro de la población total de CSC, existen subpoblaciones que presentan una proliferación activa, mientras que otras se mantienen en un estado de quiescencia.⁴¹

En secciones pasadas se mencionó que las células del estroma acondicionaban el ambiente físico y químico del tumor para el desarrollo y mantenimiento de las CSC. Las células del estroma a través de la remodelación de la matriz extracelular del tumor, y la secreción de factores de crecimiento y citocinas inflamatorias pueden reprogramar a las células tumorales para el desarrollo de la troncalidad. Esta reprogramación tiene lugar a través de modificaciones epigenéticas. Si las CSC murieran por apoptosis, las células del estroma pueden inducir la reprogramación de células cancerosas no troncales a células madre cancerosas.³⁹

1.6 Los tres pilares de la terapia contra el cáncer

El tratamiento del cáncer se ha mantenido vigente con tres diferentes enfoques terapéuticos. Cada uno con sus ventajas y desventajas, y modificaciones que se les han hecho con base en los nuevos avances en el conocimiento de la biología celular y molecular del cáncer y el avance de la tecnología. Estos tres enfoques son la cirugía, radioterapia y quimioterapia. A continuación, se describirá cada enfoque de manera individual, se mencionarán características importantes, y el fundamento biológico detrás de su aplicación en el tratamiento del cáncer.

1.6.1 Cirugía

La cirugía en el tratamiento del cáncer consiste en la extirpación total o parcial del tumor con el objetivo de erradicarlo, mejorar la sintomatología del paciente, o aumentar la eficacia terapéutica de otro tratamiento, esto cuando la cirugía se aplica de manera previa a este.⁴²

De manera general, la cirugía aplicada al tratamiento del cáncer se puede dividir en dos modalidades: cirugía abierta y cirugía mínimamente invasiva. En la primera modalidad, el cirujano realiza una gran incisión a través de la cual extrae la masa tumoral, una parte del tejido sano e incluso algunos ganglios linfáticos, según lo considere el cirujano. Por otro lado, en la segunda modalidad, el cirujano realiza una serie de pequeñas incisiones y, a través de una de estas, inserta una cámara (conocida como laparoscopia) con el objetivo de tener una imagen en tiempo real

del tejido a tratar. Finalmente, a través de las otras incisiones y guiándose de las imágenes, extrae la masa tumoral y una parte del tejido sano. Debido a que, en esta última modalidad, las incisiones que se practican son de un menor tamaño comparadas con la cirugía abierta, los pacientes se suelen recuperar más rápido.⁴²

En los últimos años, con el avance de la investigación en el cáncer y de la tecnología se han desarrollado otros tipos de cirugías considerados menos invasivos si se comparan con las ya mencionadas, aunque sus aplicaciones en la actualidad son limitadas a un cierto número de tipos de cáncer. Entre estos tipos podemos encontrar los siguientes⁴²:

- Criocirugía: consiste en el uso de gases licuados extremadamente fríos como, argón o nitrógeno, para destruir el tejido tumoral. Algunas indicaciones para este tipo de terapia son: retinoblastoma, cáncer de piel en estadios tempranos, y lesiones precancerosas de la piel y cérvix.
- Cirugía con láser: consiste en el uso de haces de luz de alta intensidad para cortar tejido anormal de manera precisa. Algunas indicaciones para este tipo de terapia son: cáncer vaginal, esofágico, y pulmonar de células no pequeñas.
- Hipertermia: consiste en el calentamiento de las zonas del cuerpo a tratar con el objetivo de destruir a la células tumorales o sensibilizarlas a un tratamiento posterior. Su modalidad más estudiada es la ablación por radiofrecuencia donde se utiliza radiación de radiofrecuencia con el objetivo de aumentar la energía cinética de las moléculas en el tejido afectado y generar calor. Este tipo de terapia aún permanece en ensayos clínicos.

- Terapia fotodinámica: consiste en el empleo de sustancias fotoreactivas a la luz de una cierta longitud de onda. Estas sustancias se administran al paciente, se concentran dentro del tumor, y cuando se incide una luz específica, estas se vuelven reactivas generando especies reactivas de oxígeno, capaces de destruir a las células tumorales por apoptosis. Algunas indicaciones para este tipo de terapia son: cáncer de piel y pulmonar de células no pequeñas.

Algunas de las ventajas de la cirugía en sus distintos tipos es la poca incidencia de efectos adversos relacionados a la terapia en pacientes. Además, en comparación con las otras terapias, es la que presenta mejores resultados en cuanto a los indicadores relacionados a la calidad de vida de los pacientes. En 2013, Sook Yeon Hwang et al. reportaron diferentes indicadores relacionados con la calidad de vida de un grupo de pacientes con cáncer de mama tratados con cirugía y otro grupo tratado con cirugía y quimioterapia adyuvante. Estos dos grupos a su vez se dividieron en tres subgrupos según el tiempo de aplicación de la cirugía, estos eran: más de un mes, pero menos de un año; más de un año, pero menos de tres años; y más de tres años. Los resultados indicaron una mayor calidad de vida en el bienestar físico, emocional, social y funcional de los pacientes tratados solo con cirugía. El grupo de pacientes tratados con cirugía y quimioterapia mostró valores elevados en los indicadores de necesidades relacionadas a la sexualidad y el inventario de depresión de Beck, un indicador utilizado para medir la severidad de la depresión. Todos estos resultados correspondieron a los grupos a los que se les aplicó el tratamiento entre un mes y un año. Conforme aumentó el tiempo de la

intervención médica, la calidad de vida entre los dos esquemas de tratamiento tendía a la igualdad.⁴³

Lamentablemente, su aplicación está totalmente limitada al tratamiento de tumores sólidos, es decir, es incapaz de aplicarse en leucemias. Otra desventaja, es que su eficacia clínica es inversamente proporcional al estadio del tumor del paciente a tratar. Según datos estadísticos la cirugía sigue manteniendo una buena eficacia clínica en los estadios 1 y 2, aunque combinándose frecuentemente con radioterapia o quimioterapia este último estadio.⁴⁴ A pesar del bajo número de efectos adversos relacionados a esta terapia, recientemente se ha reportado una elevación en el riesgo de metástasis inducida por cirugía en modelos experimentales. El mecanismo de este fenómeno se desconoce actualmente, sin embargo, se ha observado que luego del trauma inducido por la cirugía aumenta el número de células cancerígenas en circulación.⁴⁵

1.6.2 Radioterapia

La radioterapia se puede definir como el empleo de radiación ionizante en un órgano o tejido localizado con el objetivo de eliminar al tejido anormal. Por medio de la radiación de alta frecuencia, se pretende inducir daño en el ADN de las células tumorales, de tal manera que su división se detenga al entrar en senescencia replicativa, y posteriormente, mueran por apoptosis o catástrofe mitótica, siendo esta última la más común.⁴⁶

Existen dos modalidades para el empleo de la radioterapia: radioterapia externa y radioterapia interna. En la primera modalidad, la radioterapia externa, al paciente se le hace incidir un haz de radiación ionizante proveniente de una maquina en un órgano o región del cuerpo en específico. En la radioterapia interna, al paciente se le administra una capsula, semilla o cinta que contiene una sustancia emisora de radiación. Una vez dentro del cuerpo, esta sustancia emite la radiación ionizante e induce su efecto anticancerígeno. Hay que mencionar que la modalidad más empleada es la radioterapia externa, y la interna queda limitada a un cierto tipo de tumores en concreto como, por ejemplo, el cáncer de tiroides utilizando iodo 131, un isotopo del iodo radiactivo.⁴⁶

La radioterapia, dentro de sus ventajas, presenta mejores eficacias clínicas en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer cuando se comparan con las obtenidas por la cirugía y equiparables a las de la quimioterapia. Por este motivo, su aplicación va más allá de los tumores en estadios 1 y 2, pudiendo utilizar incluso en tumores metastásicos de estadio 4.⁴⁴ Por otro lado, dentro de sus principales desventajas, y de hecho siendo esta la principal limitante de la terapia (al igual que con la quimioterapia) se encuentra el desarrollo de un elevado número de efectos adversos. Estos efectos adversos que pueden ser a corto y a largo plazo se caracterizan por lesiones en órganos con una elevada tasa mitótica. Dentro de los efectos a corto plazo los más comunes suelen ser el desarrollo de leucopenia debido al daño de la médula ósea; alopecia debido al daño a las células del folículo piloso; y, diarrea, vomito, mucositis y estomatitis debido al daño de las células de las mucosas del tubo digestivo. En lo que respecta a los efectos adversos a largo plazo

se reporta el desarrollo de segundas neoplasias, infertilidad, toxicidad cardiopulmonar (riesgo de muerte cardiaca y fibrosis pulmonar), toxicidad gastrointestinal (desarrollo de dispepsia y úlceras pépticas), alteración de la función endocrina (tiroiditis, hipotiroidismo e hipertiroidismo).^{47,48}

1.6.3 Quimioterapia

La quimioterapia consiste en el empleo de sustancias químicas con actividad biológica con el objetivo de inducir la inhibición del crecimiento celular o la apoptosis en las células tumorales. Según los esquemas a seguir en el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer, la quimioterapia es la terapia más utilizada, apareciendo en la mayoría de estos.⁴⁹

La quimioterapia comprende una gran variedad de fármacos anticancerígenos que difieren en su mecanismo de acción. Esta diferencia es la base para su clasificación farmacológica y para el diseño de esquemas quimioterapéuticos. A continuación, se mencionarán y describirán de manera breve algunas de las familias farmacológicas más importantes de las que se compone la quimioterapia.

- **Agentes alquilantes:** dentro de los agentes alquilantes recaen diferentes grupos de fármacos que, aunque difieren en estructura, presentan un mecanismo de acción muy similar. Todos se caracterizan por generar una especie química altamente reactiva, un electrófilo, luego de entrar en la célula. Este electrófilo se caracteriza por presentar una deficiencia de

electrones y, por ende, puede sufrir un ataque nucleofílico de una molécula con alta densidad electrónica (nucleófilo) formando un enlace químico. Usualmente, en el caso de estos fármacos, el nucleófilo más común suele ser la guanina presente en el ADN, sin embargo, otras bases nitrogenadas también pueden efectuar el ataque. Dependiendo del fármaco, luego de la formación de este enlace químico la base nitrogenada queda alquilada. Algunos miembros de los agentes alquilantes tienen la capacidad de sufrir dos ataques nucleofílicos y generar dos enlaces químicos con diferentes guaninas dentro de la misma molécula de ADN. Esto genera enlaces intramoleculares en la molécula de ADN ocasionando daño por rupturas y errores en los procesos de replicación. La acumulación de todo el daño al ADN inducido por los agentes alquilantes induce la muerte celular programada. Debido a que estos fármacos actúan principalmente en el ADN, se dice que son específicos de la fase S, siendo esta la fase del ciclo celular donde el ADN está más expuesto para efectuar los ataques nucleofílicos y la célula es más vulnerable al daño al ADN. La familia de los agentes alquilantes se compone de las mostazas nitrogenadas como ciclofosfamida; las nitrosoureas como la estreptozocina; los triazenos como la temozolomida; los alquilsulfonatos como el busulfán; y las etileneiminas como la tiotepa.⁴⁹

- **Análogos del platino:** este grupo de fármacos se caracteriza por la presencia de platino en su estructura. Ahí el platino actúa como un ácido de Lewis (electrófilo), y es capaz de coordinarse con diferentes ligandos (orgánicos o inorgánicos) ricos en electrones. Dentro de la célula, los análogos del platino pueden dissociarse de algunos de sus ligandos, y

coordinarse con moléculas de agua. Los grupos hidroxilo coordinados con el platino ejercen un fuerte efecto inductivo a causa de la electronegatividad del oxígeno, conduciendo a la polarización del platino que desarrolla una carga parcial positiva. En estas circunstancias el platino actúa como un fuerte electrófilo y es atacado por las bases nitrogenadas del ADN conduciendo a la formación de enlaces intra e intermoleculares entre las diferentes moléculas de ADN. Estas modificaciones en el ADN conducen a la generación de rupturas, inhibición de la replicación y la transcripción y, posteriormente, a la apoptosis. Estos fármacos también se consideran específicos de la fase S, por las razones antes mencionadas. Como ejemplos de este grupo, se encuentran el cisplatino, oxaliplatino y carboplatino.⁴⁹

- **Antimetabolitos:** estos fármacos guardan una similitud estructural con metabolitos endógenos de la replicación del ADN o la biosíntesis de nucleótidos. Debido a su estructura química, la célula puede incorporarlos en la replicación del ADN y ocasionar fallos por mal apareamiento de bases que conducen a la aparición de mutaciones. La acumulación de mutaciones genera inestabilidad genómica y, por último, la apoptosis. Además, algunos fármacos pueden llegar a inhibir algunas enzimas claves de la biosíntesis de purinas y pirimidinas, un ejemplo de esto es la inhibición de la timidilato sintasa con la consecuente escasez de timina. La timina es un nucleótido esencial en los procesos de reparación del ADN, de tal manera, que al sumar esta inhibición con el efecto mutágeno de los antimetabolitos, este último se ve potenciado. Los antimetabolitos se consideran específicos de la fase S.

Algunos ejemplos de esta familia son: el 5-fluorouracilo, capecitabina, y citarabina.⁴⁹

- **Antifolatos:** su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la dihidrofolato reductasa, una enzima clave en la biosíntesis de nucleótidos. Este mecanismo surge debido a la similitud estructural que comparten los antifolatos con el ácido fólico. Dentro de este grupo, el fármaco más destacado es el metotrexato. Al igual que las familias pasadas, los antifolatos se consideran específicos de fase S.⁴⁹
- **Inhibidores de la topoisomerasa I y II:** son una familia de fármacos con estructuras muy diversas entre sí que comparten mecanismo de acción. Dentro de los inhibidores de la topoisomerasa I y II se encuentran el topotecán e irinotecán (derivados de la camptotecina) y, la doxorubicina y daunorrubicina (antraciclinas), respectivamente. Su mecanismo de acción se lleva a cabo a través de la generación de un complejo ternario entre el fármaco, el ADN y la ADN topoisomerasa correspondiente. En esta forma, la actividad de la ADN topoisomerasa disminuye, especialmente su actividad de religación del ADN, y no es capaz de aliviar la tensión torsional inducida por el proceso de replicación del ADN correctamente, generando rupturas e induciendo la muerte celular. Además, en el caso de las antraciclinas, dentro de la célula, promueven la generación de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 y $HO\bullet$) que atacan al ADN y oxidan sus bases, contribuyendo al proceso de inducción de apoptosis. Estos fármacos se consideran específicos de la fase S.⁴⁹

- **Agentes antimicrotubulares:** son una familia de fármacos antineoplásicos cuyo mecanismo de acción recae sobre la beta-tubulina, un componente monomérico de los microtúbulos que se dimeriza con la alfa-tubulina. Dentro de esta familia se encuentran los inhibidores de la polimerización de los microtúbulos como los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina) y los estabilizadores de microtúbulos como los taxanos (paclitaxel y docetaxel). A través de su unión a la beta-tubulina monomérica, los alcaloides de la Vinca evitan su polimerización con alfa-tubulina en los microtúbulos y la correspondiente formación del huso mitótico, arrojando el ciclo celular en la metafase. Por otro lado, al unirse a la beta-tubulina de los microtúbulos ya polimerizados, los taxanos bloquean su desensamblado, conduciendo a la generación de estructuras poliméricas aberrantes y afectando la mitosis. En ambos mecanismos de acción, el resultado final es la apoptosis. Los agentes antimicrotubulares se consideran específicos de la fase M, por afectar principalmente a la mitosis.⁴⁹
- **Inhibidores de tirosín cinasas:** esta familia de fármacos antineoplásicos se considera como terapia dirigida debido a que sus efectos toxicológicos son menores en comparación a los de las familias previas, a las que comúnmente se le denomina terapia citotóxica. Los inhibidores de tirosín cinasas son relativamente nuevos en su aplicación contra el cáncer. Su mecanismo radica en la inhibición de proteínas tirosina cinasas (sobreexpresadas en el cáncer) debido a su afinidad por el sitio de unión a ATP de las proteínas diana. Este tipo de proteínas forman parte de las vías de señalización que controlan los procesos mitogénicos, angiogénicos, y de expresión génica en la célula

tumoral. Algunos de los fármacos de esta familia más exitosos son el imatinib, un inhibidor de la proteína BCR-ABL; erlotinib, un inhibidor de la proteína EGFR; y sunitinib, un inhibidor de la proteína VEGFR2.^{49,50}

Dentro de las ventajas de la quimioterapia se encuentra su elevada versatilidad para aplicarse al tratamiento de los distintos tipos de cáncer, a través de los diferentes estadios, en solitario o en combinación con otros tratamientos como radioterapia o cirugía. Una de las ventajas más importantes de la quimioterapia es su aplicación para el tratamiento de tumores líquidos como leucemias.⁴⁴

A pesar de ser la terapia más utilizada en el tratamiento de las diferentes variantes del cáncer, la quimioterapia también es el tratamiento que más efectos adversos presenta. Todos los fármacos citotóxicos y dirigidos que se presentaron anteriormente son altamente selectivos por una o un grupo reducido de proteínas diana esenciales de la célula tumoral. Sin embargo, por la naturaleza de los mecanismos de acción de las diferentes familias de la quimioterapia, estos fármacos son poco específicos en cuanto a su efecto citotóxico, ya que las células tumorales no son las únicas células que presentan una elevada tasa de proliferación. Las células de la mucosa del tubo digestivo y aquellas de la médula ósea presentan tasas de proliferación igualmente elevadas debido a su función fisiológica en los papeles de digestión y defensa, respectivamente. Por este motivo, todas aquellas células que mantengan una proliferación elevada sean tumorales o no, son vulnerables a los efectos de la quimioterapia.

Existen dos tipos de efectos que la quimioterapia puede generar, dependiendo del período de tiempo en el que se presentan y los efectos que indujo en las células: 1)

efectos a corto plazo caracterizados por la inducción de apoptosis en los tejidos sanos, y 2) efectos a largo plazo caracterizados por la inducción de senescencia en los tejidos sanos debido al estrés oxidativo, daño al ADN y arresto del ciclo celular inducidos por la terapia. Los efectos a corto plazo más destacados son: mielosupresión, diarrea, estomatitis, fatiga y alopecia.⁵¹ A largo plazo los efectos más destacados son: cardiotoxicidad, neurotoxicidad, neumotoxicidad, infertilidad y nefrotoxicidad. Además, se ha reportado un aumento en el riesgo del desarrollo de segundas neoplasias en los pacientes luego de someterse a quimioterapia o radioterapia.⁵²

Por estas razones negativas, y debido a que el cáncer sigue representando un problema de salud pública creciente, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos con actividad anticancerígena pero que carezcan de las desventajas de la quimioterapia actual.

1.7 Promiscuidad molecular: un nuevo enfoque en la farmacología

Hasta el día de hoy, en la química medicinal la creación de fármacos se ha estado enfocando en el diseño de moléculas altamente selectivas a una sola diana molecular. Aunque este enfoque ha traído consigo el desarrollo de fármacos potentes para el tratamiento de diversas enfermedades, pareciera ser que, en el caso del cáncer, este enfoque podría no ser el más adecuado.

La química medicinal, desde sus primeros inicios, ha venido desarrollando moléculas potentes y altamente selectivas para el tratamiento del cáncer (y otras

enfermedades) bajo el siguiente paradigma: un gen, un fármaco, una enfermedad. Este paradigma se sostiene bajo la idea de que una enfermedad es el resultado fenotípico de uno o más defectos genéticos y que, por lo tanto, su tratamiento deberá estar enfocado en la modulación (ya sea positiva o negativa) de los productos de estos genes, normalmente proteínas. En muchos casos, llevar a cabo esta modulación no es posible y, en su lugar (en el caso del cáncer), se suelen aprovechar las diferencias funcionales inducidas en las células por estos defectos genéticos para eliminarlas utilizando como dianas moleculares proteínas esenciales, como las del ciclo celular. Esto lo podemos visualizar en las dianas moleculares de la quimioterapia citotóxica que se expusieron anteriormente, donde algunos de los blancos eran la ADN topoisomerasa, beta-tubulina, o directamente el ADN. Solo aquellas células con una proliferación elevada, que presenten altas concentraciones de estas proteínas se verían afectadas, aprovechando de esta manera los efectos inducidos por los defectos genéticos sobre la proliferación como una medida de selectividad.

Lamentablemente, como se mencionó en la sección pasada, el enfoque citotóxico que ha adoptado la quimioterapia al dirigir su actividad a moléculas tan esenciales en la célula por medio de compuestos “selectivos” y potentes, la ha dotado de una elevada toxicidad hacia otras células del organismo con un alto recambio metabólico y que carecen de defectos genéticos.

Con el desarrollo de los inhibidores de tirosín cinasas, y con el éxito del imatinib mesilato en el tratamiento de leucemia mieloide crónica, el diseño de fármacos antineoplásicos se centró directamente sobre las proteínas afectadas por los

defectos genéticos, la familia de las proteína tirosín cinasas como el EGFR, BCR-ABL, VEGFR2, etc. Debido a que el mecanismo de acción de esta familia de fármacos se debía a la inhibición competitiva con el ATP por el sitio de unión a nucleótidos de las proteínas en el dominio catalítico, y debido a que las cinasas presentan un elevado grado de homología en su dominio catalítico entre ellas, se ha observado que los inhibidores de tirosín cinasas inhiben diferentes proteína tirosín cinasas, desviándose de los ideales de selectividad.⁵³ Sin embargo, debido a que la célula tumoral sobreexpresa este tipo de proteínas para sus vías de señalización, su inhibición por este tipo de moléculas conlleva al arresto del ciclo celular y a la apoptosis. A diferencia de la quimioterapia citotóxica, los inhibidores de tirosín cinasas suelen ser mejor tolerados por los pacientes.^{54,55} A partir de este punto, con esta familia de fármacos, inició la tendencia de la promiscuidad molecular.

La promiscuidad molecular se define como la capacidad de un compuesto de interactuar con más de una diana molecular. En la actualidad, a la aplicación de la química medicinal para el diseño de este tipo de compuestos también se le conoce como polifarmacología.⁵⁶

Los inhibidores de tirosín cinasas fueron una de las primeras familias de fármacos en caer dentro de esta clasificación luego de identificar el grupo de proteínas en las que estos actuaban. Por ejemplo, existe evidencia experimental de la inhibición del imatinib sobre las proteínas ABL1, KIT, PDGFR α , PDGFR β ; y el afatinib inhibe a las proteínas ERBB2 (HER2) y EGFR.⁵⁷ Además, se cree que el número real de blancos terapéuticos de estas moléculas podría estar subestimado de acuerdo con algunos

estudios computacionales.⁵⁶ A pesar de ser moléculas promiscuas, los inhibidores de tirosín cinasas siguen presentando constantes de inhibición enzimática que van desde nM hasta $<10 \mu\text{M}$.⁵⁸ Esto representa un problema pues, aunque son más seguros que la quimioterapia citotóxica, siguen manteniendo los mismos efectos adversos a corto y largo plazo, ya que las proteínas tirosín cinasas también presentan una actividad enzimática elevada en los órganos con alto recambio metabólico, donde inducen la proliferación y supervivencia de los tejidos.^{59,60}

Esta problemática representa un área de oportunidad ya que, en condiciones de promiscuidad molecular, una inhibición moderada de las proteínas blanco podría ejercer mejores resultados que una inhibición fuerte. Además de presentar un perfil toxicológico menos sombrío o desalentador. En la siguiente sección se abordará con mayor detalle esta problemática, y se mencionarán algunos fármacos actuales que cumplen estas características deseadas para el presente proyecto.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Fármacos promiscuos en el cáncer: metformina, un ejemplo de promiscuidad molecular

Los fármacos promiscuos representan una oportunidad terapéutica novedosa en el tratamiento del cáncer. Esta afirmación se puede justificar con dos sencillas razones: 1) son capaces de modular el microambiente tumoral y 2) son capaces de modular a las células madre cancerosas. A continuación, se describirán detalladamente estas dos características utilizando como ejemplo a la metformina.

La metformina es un fármaco antidiabético de primera línea y sensibilizador de insulina. A inicios de su comercialización solo se conocían sus efectos sobre la glucemia: 1) inhibición de la gluconeogénesis hepática y 2) aumento en la acción de la insulina. Estos efectos se deben a la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones. Dicha inhibición disminuye la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa, lo que conlleva a una disminución en el ratio $[ATP]/[AMP]$. Las concentraciones elevadas de AMP activan a la proteína LKB1 una quinasa que fosforila y activa a la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), el regulador maestro del metabolismo energético.⁶¹

La proteína AMPK es un inhibidor global de los procesos anabólicos. Esta cinasa se encarga de fosforilar a proteínas clave implicadas en las vías biosintéticas de la célula, de tal manera que se afectan a la baja los procesos de biosíntesis de lípidos,

síntesis de proteínas, y síntesis de glucógeno y glucosa a través de la glucogenogénesis y gluconeogénesis, respectivamente. Algunas de las proteínas sometidas a regulación por AMPK son: ACC1/2, CD36, y SREBP1c en cuanto al metabolismo de lípidos; mTORC1/eEF2K en cuanto a la síntesis de proteínas; y glucógeno sintasa, CRT2, PFKFB2/3, y glucógeno fosforilasa en cuanto al metabolismo de carbohidratos. Además de sus efectos metabólicos, la proteína AMPK tiene la capacidad de regular a la baja proteínas relacionadas con los procesos inflamatorios como TNF- α y IL-6, y proteínas relacionadas con los procesos angiogénicos como VEGF a través de la inhibición de los factores de transcripción NF- κ B y HIF1 α , respectivamente.⁶¹

Como se mencionó en las secciones pasadas, las células tumorales presentan un metabolismo anormal, existiendo dentro del tumor poblaciones de células que utilizan la fosforilación oxidativa y otras poblaciones que se inclinan por el metabolismo anaerobio (efecto Warburg). A través de la inhibición del complejo I mitocondrial, la metformina es capaz de aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno e inducir la muerte celular por apoptosis. Además, en aquellas células anaerobias, como las células madre cancerosas que expresan HIF1 α , se ha observado una disminución en los niveles de metabolitos glucolíticos y del ciclo de Krebs, llevando a la célula a una crisis energética.^{62,63} Estos datos se podrían relacionar con el reporte de Janzer *et al.* acerca de las anomalías en la biosíntesis de nucleótidos y metabolismo de folatos de las células cancerígenas CAMA-1 y las células madre cancerosas CAMA-1 expuestas a tratamientos con metformina (300 μ M).⁶²

Continuando con los mecanismos biológicos de la metformina, se sabe que la inflamación crónica es un componente esencial del origen y mantenimiento de las poblaciones troncales de células cancerosas. La metformina ha mostrado disminuir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y VEGF a través de la inactivación de NF- κ B y HIF1 α .⁶⁴⁻⁶⁶ Además, debido a que la metformina reduce la producción de VEGF, el proceso de angiogénesis tumoral se ve afectado, reduciendo así el crecimiento del tumor.⁶⁷

Fuera de la activación de AMPK, la metformina también ha demostrado ser capaz de inhibir las vías de señalización Hedgehog, Wnt/ β -catenina y TGF- β , esenciales para establecer las características de troncalidad (o Stemness en inglés) y, que conducen al desarrollo de la población de células madre cancerosas. De acuerdo con Fan *et al.*, tratamientos con metformina (3 mM) en diferentes líneas celulares de cáncer de mama condujeron a la regulación negativa de los genes y la expresión de las proteínas Shh, Smo, Ptch1, y Gli1, todos componentes de la vía de señalización Hedgehog.⁶⁸ En el caso de la vía TGF- β , implicada en el proceso EMT, la metástasis y la resistencia farmacológica, se ha observado que la metformina es capaz de revertir el programa EMT en células de cáncer de mama MDA-MB-231 al inhibir los niveles de ARNm de los factores de transcripción ZEB1, TWIST1, y SNAI2, y las citocinas TGF β 1-3.⁶⁹

2.2 Productos naturales como fuentes de fármacos promiscuos

Como se mencionó en secciones previas, debido a los efectos negativos de la quimioterapia y a las cifras alarmantes de incidencia y mortalidad del cáncer, constantemente existe una necesidad de desarrollar fármacos con actividad anticancerígena y con menos toxicidad. Para cumplir con este objetivo, la química medicinal frecuentemente se apoya en la farmacognosia, aquella rama de la farmacología encargada de estudiar los productos naturales.

Los productos naturales son una fuente inagotable de agentes anticancerígenos. Prueba de esto son las estadísticas acerca de la naturaleza de los agentes quimioterapéuticos actuales. Según las estadísticas alrededor del 60% de los fármacos aprobados por la FDA son productos naturales o derivan de ellos.⁷⁰

Lamentablemente, los criterios de selección empleados en los productos naturales para estudiarlos o derivatizarlos, se han basado en estudios de citotoxicidad *in vitro*. De hecho, es el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos el que se ha encargado de promover esta metodología con el panel de evaluación NCI 60, donde se evalúan *in vitro* las posibles moléculas candidatas contra 60 líneas celulares inmortalizadas a una concentración de 50 μM .⁷¹ Sin embargo, este enfoque de selección se ha planteado bajo la idea de eliminar células tumorales indiscriminadamente, sin entender por completo la heterogeneidad de los tumores, y sin entender la capacidad plástica para adaptarse de las células tumorales.⁷² Por estos motivos, los productos naturales que se han tomado para derivatizar culminan en el diseño de fármacos citotóxicos que terminan dañando al paciente, en la

generación de resistencia farmacológica en un tiempo corto, en un comportamiento más agresivo del tumor, o todas estas cuestiones juntas.⁷²

Un enfoque de selección diferente debe aplicarse para la identificación adecuada de productos naturales en el tratamiento contra el cáncer. Un ejemplo claro de esta necesidad es la metformina. La metformina, una molécula promiscua derivatizada del producto natural galegina, presenta un rango amplio de efectos anticancerígenos, sin embargo, su citotoxicidad en líneas inmortalizadas está en la escala milimolar, casi mil veces la concentración deseada por el NCI 60.

Así como la metformina, existen otros productos naturales con promiscuidad molecular cuyo potencial no ha sido explotado del todo, y que podrían ser buenos farmacóforos para el diseño de nuevos agentes anticancerígenos. Algunos ejemplos son los flavonoides, estilbenos, derivados del ácido cinámico, y sustancias de origen indólico como la isatina y el indol-3-carbinol. En la siguiente sección nos enfocaremos en describir a estos dos últimos.

2.3 Isatina, indol-3-carbinol y el grupo sulfonamida

La isatina es un metabolito que se produce de manera natural como parte del metabolismo oxidativo del indol. Su estructura es análoga a este último, difiriendo en el anillo de cinco miembros a causa de la presencia de un sistema alfa-cetoamida. Esto conlleva a la pérdida de la aromaticidad en este anillo. En la figura 5 se puede observar la estructura del indol y de la isatina.

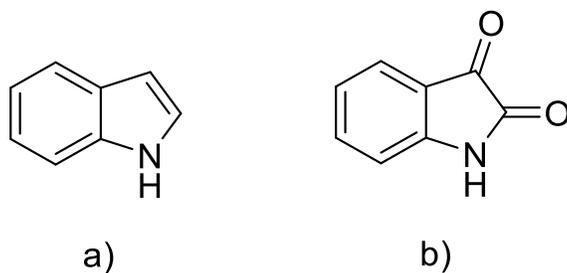


Figura 5. Estructura química del indol (a) y de la isatina (b).

La isatina y sus derivados han demostrado un amplio espectro farmacológico de interés para el tratamiento de múltiples enfermedades. Existen reportes de su actividad antiviral, analgésica, anticonvulsivante, antioxidante, antituberculosa, antidepressiva, y anticancerígena. Como parte de su actividad anticancerígena, se ha reportado un efecto antiproliferativo en células tratadas con isatina y derivados (60 – 100 μM) a través de la reducción en la actividad y fosforilación de las proteínas ERK y ERK2, respectivamente, ambas implicadas en la vía de las MAPK cinasas.⁷³ Además, se ha reportado la modulación del sistema inmune, componente clave del tumor, mediante tratamientos con isatina (10 – 100 μM) donde inhibió la producción de prostaglandina E2, óxido nítrico, interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa en una línea de macrófagos RAW264.7.⁷⁴ A nivel metabólico, la isatina ha demostrado ser capaz de unirse a la enzima glucolítica GAPDH con constantes de disociación entre 3.1 – 12 μM .⁷⁵

La isatina y sus derivados se caracterizan por ser buenos inhibidores de proteína cinasas como, por ejemplo, cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), entre otras. Un ejemplo de fármaco derivado de la isatina

que explota esta cualidad es el sunitinib, un agente antineoplásico utilizado para el tratamiento del carcinoma de células renales avanzado.⁷⁶ El sunitinib ejerce su efecto antiproliferativo mediante la inhibición de las proteínas VEGFR1, PDGFR y c-Kit (CD117) que ya han mencionado en la sección de biología celular y molecular del cáncer.⁷⁷ En la figura 6 se muestra la estructura química del sunitinib.

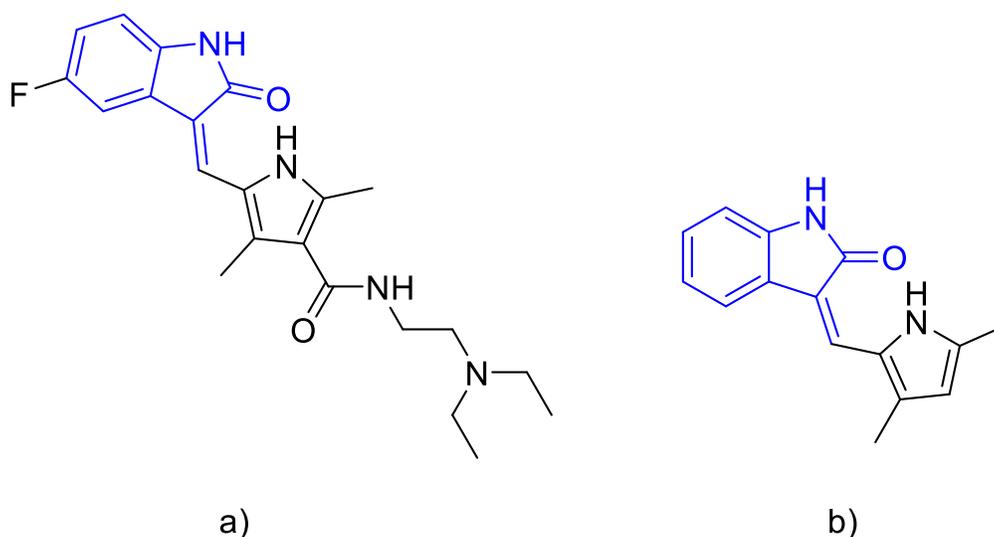


Figura 6. Estructura química del sunitinib (a) y semaxanib (b) donde se remarca el farmacóforo de isatina en azul.

Además, del sunitinib existen otros fármacos basados en isatina que, aunque no han sido aprobados por la FDA, se han sometido a evaluar su actividad anticancerígena en ensayos clínicos como el semaxinib, un inhibidor de las proteínas VEGFR y PDGFR que alcanzó la fase 3 al evaluarse contra cáncer colorrectal.⁷⁷ En la figura 6 se muestra la estructura química del semaxanib.

Otro producto natural de origen indólico que ha mostrado un repertorio de efectos biológicos de interés en la terapia contra el cáncer es el indol-3-carbinol (I3C) (véase

la figura 7). Entre los efectos más estudiados del I3C se encuentra la regulación de la actividad de diversos factores de transcripción como: el receptor de estrógenos alfa (ER α), Sp1, NF- κ B, y AhR.⁷⁸

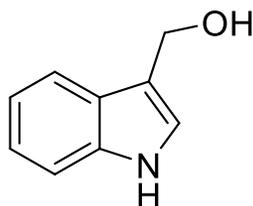


Figura 7. Estructura química del indol-3-carbinol.

En el caso del ER α se han reportado modificaciones conformacionales inducidas por tratamientos con I3C (10-125 μ M) que conducen a la disminución en la señalización y en la actividad transcripcional del receptor.⁷⁹ Los tratamientos con I3C (50 μ M) en células MCF-7 de cáncer de mama evitan completamente la activación del ER α por fosforilación.⁸⁰ Por otro lado, en células MDA-MB-231 negativas para ER, se ha observado que el I3C es capaz de inducir cambios en la afinidad por los sitios de unión del factor de transcripción Sp1, afectando a la baja la expresión de la CDK6, y aumentando la expresión de p21, una proteína de arresto del ciclo celular que inhibe la fosforilación de retinoblastoma por la CDK2, evitando así la entrada de la célula a la fase S del ciclo celular.^{81,82} Finalmente, el I3C ha demostrado ser capaz de inducir apoptosis a través de la disminución en la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 a causa de la inactivación de Akt y NF- κ B. Células de la línea inmortalizada MCF7Ala entraron en apoptosis dentro de dos días luego de un tratamiento con I3C de 60 μ M y dentro de 24 horas en aquellas células que se expusieron a tratamientos de 100 μ M.⁸³

En la actualidad no existen fármacos derivados o que incorporen al I3C en su estructura. Sin embargo, el I3C está presente de manera natural en todas las crucíferas, formando parte de los compuestos quimiopreventivos de las dietas vegetarianas y veganas que protegen contra el desarrollo de cáncer y otras enfermedades crónicas.⁸⁴

Hasta aquí hemos revisado la promiscuidad molecular de la isatina y el indol-3-carbinol con base en algunos reportes de su actividad biológica. Sin embargo, fuera de las plataformas de los productos naturales, en la química medicinal, existen algunos farmacóforos bien reconocidos que también son capaces de aportar promiscuidad molecular. Un ejemplo de estos farmacóforos es el grupo sulfonamida. Su presencia en múltiples estructuras químicas puede llevar a diferentes efectos biológicos, entre estos se encuentran la actividad antimicrobiana, hipoglucémica, diurética, y antitumoral.

La actividad antitumoral de la sulfonamida se ha observado en compuestos de tipo arilo, donde el grupo sulfonilamida está directamente enlazado a un anillo aromático.⁸⁵ Actualmente, incluso se está llevando a cabo el reclutamiento de pacientes para un ensayo clínico fase II con el objetivo de evaluar el efecto antineoplásico de la p-toluensulfonamida, una arilsulfonamida, en pacientes con carcinoma hepatocelular (véase la figura 8).⁸⁶

Uno de los compuestos donde la incorporación de la sulfonamida se llevó a cabo de buena manera fue el caso del indisulam, un inhibidor de CDKs que induce el arresto del ciclo celular en la fase G1/S de las células tumorales. La estructura del indisulam presenta una alta homología con la estructura del ATP, por lo que podría actuar

como un inhibidor competitivo por el sitio de unión a nucleótido de las CDK. Actualmente, se ha evaluado el indisulam hasta la fase 2 de los ensayos clínicos en distintos tipos de cáncer.⁸⁷ En la figura 8 se muestra la estructura química del indisulam.

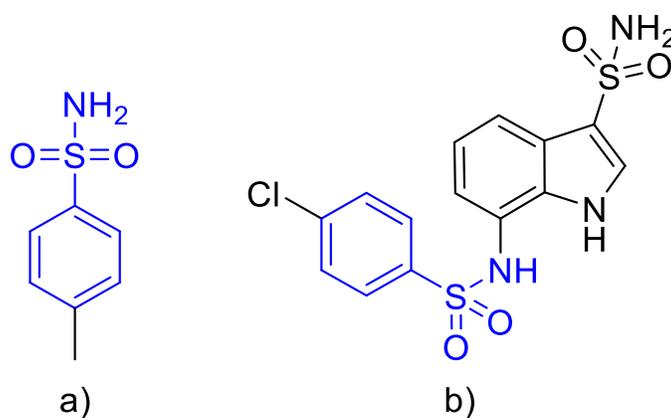


Figura 8. Estructura química de la p-toluensulfonamida (a) y del indisulam (b) donde se remarca al farmacóforo de sulfonamida en azul.

2.4 Híbridos de isatina

La isatina es una plataforma útil para el desarrollo de múltiples agentes bioactivos. Prueba de ello son los reportes de su actividad y los fármacos en los que ésta se ha incorporado como un farmacóforo que se mencionaron en la sección pasada.

Por este motivo, en el presente proyecto se decidió llevar a cabo el diseño de híbridos de isatina con diferentes farmacóforos de interés (indol-3-carbinol y p-toluensulfonamida) con el objetivo de potenciar la capacidad de promiscuidad intrínseca de la isatina, y mejorar su actividad anticancerígena. Los criterios estructurales y funcionales que se tomaron en cuenta para el diseño de los híbridos

que se propusieron en el presente proyecto se mencionarán en la sección de metodología y, con mayor detalle, en la sección de resultados y discusión.

En 2001, Bramson *et al.* diseñaron y sintetizaron distintas series de derivados de 3-(p-sulfonilaminofenilhidrazinil) isatina: las series 4, 5, 6, 7, y 4,5. Estas diferían una de la otra y recibían su nombre de acuerdo con la posición de los sustituyentes en la molécula. La estructura base de todas las series se muestra a continuación en la figura 9.

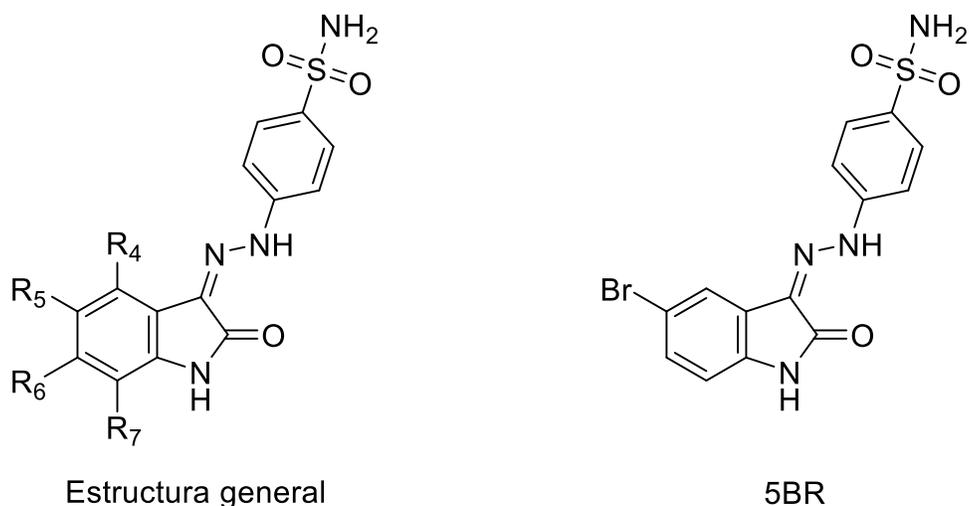


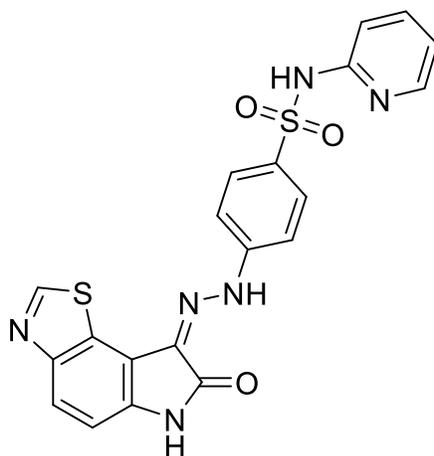
Figura 9. Estructura química general de la 3-(p-sulfonilaminofenilhidrazinil) isatina (izquierda) y de su derivado bromado en la posición 5 (derecha), ambos sintetizados por Bramson *et al.* en 2001.

Una vez sintetizadas todas las series, estas se evaluaron contra las cinasas dependientes de ciclinas 1 (CDK1) y 2 (CDK2) mediante un ensayo de inhibición enzimática. Los resultados de estos ensayos sirvieron para identificar al compuesto 5BR (perteneciente a la serie 5) como un compuesto líder debido a su elevada selectividad por la CDK2 sobre CDK1 con IC₅₀ de 60 nM y 780 nM, respectivamente.

Para indagar más sobre la interacción entre 5BR y CDK2, el grupo de investigación de Bramson, llevó a cabo un acoplamiento molecular entre el 5BR y el sitio de unión a nucleótido de la CDK2 con el objetivo de identificar los residuos de aminoácidos clave para su unión. Estos residuos de aminoácidos fueron Ile10, Phe85, Asp86 y Leu87⁸⁸.

Si descomponemos la estructura del compuesto 5BR en sus componentes farmacofóricos obtenemos 3 piezas estructurales: la isatina, la bencenosulfonamida, y un ligante de hidrazina.

Ese mismo año, Davis *et al.*, basándose en la estructura del compuesto 5BR, diseñaron y sintetizaron un compuesto 45SN con sustituciones adicionales en las posiciones 4 y 5 del anillo aromático isatínico, una N-arilación del grupo amino de la porción de bencenosulfonamida, y un cambio de ligante en el ligante de ambas porciones. A continuación, en la figura 10 se muestra la estructura química de 45SN.



45SN

Figura 10. Estructura química del derivado 45SN sintetizado por David et al. en 2001.

El compuesto 45SN se sometió a un ensayo de inhibición enzimática con las enzimas CDK1 y CDK2, obteniéndose IC₅₀ de 110 nM y 10 nM, respectivamente. Comparado con el compuesto 5BR, el compuesto 45SN era seis veces más afín a la CDK2 y un 18% más selectivo sobre CDK2 que CDK1. Estos resultados enzimáticos se confirmaron en la línea celular de fibroblastos diploides humanos (DPF, por sus siglas en inglés). La exposición de las células DPF al compuesto 45SN (7.5 μM) condujo al arresto del ciclo celular en la fases G1, G2 y M. Además, mediante un análisis Western Blot se comprobó el estado de fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb), observándose un cambio de hiper a hipofosforilación luego de la exposición al compuesto 45SN. Cabe mencionar que la fosforilación de Rb es esencial para la progresión de la célula a la fase S, y la CDK2 es la proteína cinasa encargada de llevar a cabo esta tarea.⁸⁹

En 2012, Hassan *et al.* patentaron un grupo de moléculas derivadas de la plataforma N,N'-hidrazinil-bis-isatina (HBI). El derivado HBIa presentó actividad anticancerígena contra las líneas celulares KB-3-1 y su versión multifarmacoresistente KB-V1. Los IC₅₀ observados de la evaluación biológica de BIHa fueron de 7.67 μM y 4.80 μM, respectivamente. Por otro lado, el derivado HBIf, se evaluó contra un panel de líneas celulares inmortalizadas demostrando actividad anticancerígena prometedora contra la línea HepG2 con un IC₅₀ de 4.23 μM e induciendo arresto del ciclo celular en la fase G2/M. Un análisis molecular posterior para conocer el mecanismo de acción de HBIf identificó a la regulación negativa de la ciclina B1 y la proteína cdc2 como el posible efecto biológico. En la figura 11 se muestra la estructura química de los derivados HBIa y HBIf⁹⁰.

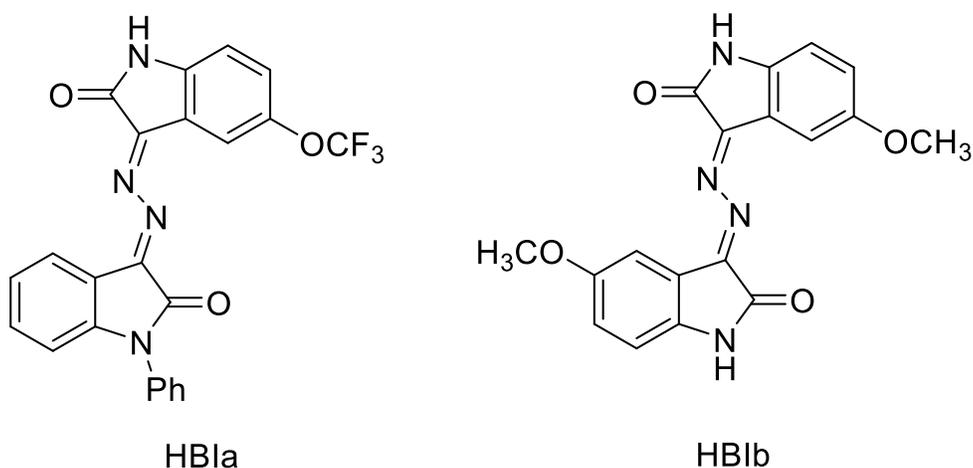


Figura 11. Estructura química de los derivados HBIa y HBIf patentados por Hassan *et al.* en 2012.

En 2014, Liang *et al.* sintetizaron y llevaron a cabo la evaluación *in vitro* e *in vivo* de bases de Schiff de isatina simétricas. Se identificó al compuesto BIS como el más

activo en las líneas celulares A549, HeLa, HepG2, U251 y SGC-7901 con IC₅₀ de 12.78 μM, 8.6 μM, 4.23 μM, 29 μM, y 12.66 μM, respectivamente, utilizando 5-FU como control positivo (con IC₅₀ de 17.31 μM, 7.32 μM, 19.76 μM, 28.45 μM, >100 μM para esas líneas celulares en el mismo orden). En la figura 12 se muestra la estructura química del compuesto BIS.

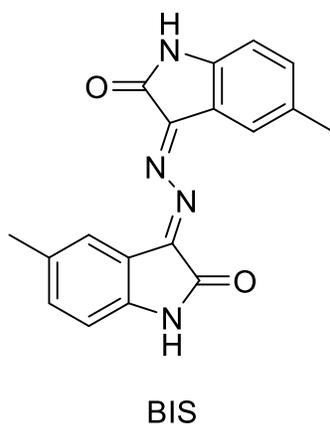


Figura 12. Estructura química del derivado BIS sintetizado por Liang et al. en 2014.

El compuesto BIS se sometió a un ensayo de actividad antitumoral mediante un ensayo de xenoinjerto, donde se demostró la disminución en el peso y tamaño del tumor de manera dosis dependiente. Al comparar el efecto antitumoral del 5-FU (25 mg/kg) y BIS (40 mg/kg) se observa un mayor porcentaje de reducción de este último, con valores del 47% y 60%, respectivamente. Además, se pudo comprobar que este efecto se debía, posiblemente, al arresto al ciclo celular en la fase G2/M que el compuesto BIS indujo en las células HepG2⁹¹.

Finalmente, en 2018, Eldehna *et al.* sintetizaron y evaluaron la actividad citotóxica *in vitro* de nuevos agentes antiproliferativos basados en la 3-[(3-

(indolilmetil)hidrazonil] isatina. De todas estas sustancias, se destacaron las dos más prometedoras en cuestiones biológicas, identificadas como IMIa e IMIb. Estas se seleccionaron luego de una evaluación de citotoxicidad sobre el panel NCI de líneas celulares para el descubrimiento de agentes anticancerígenos. A continuación, en la figura 13 se muestra la estructura química de estas moléculas.

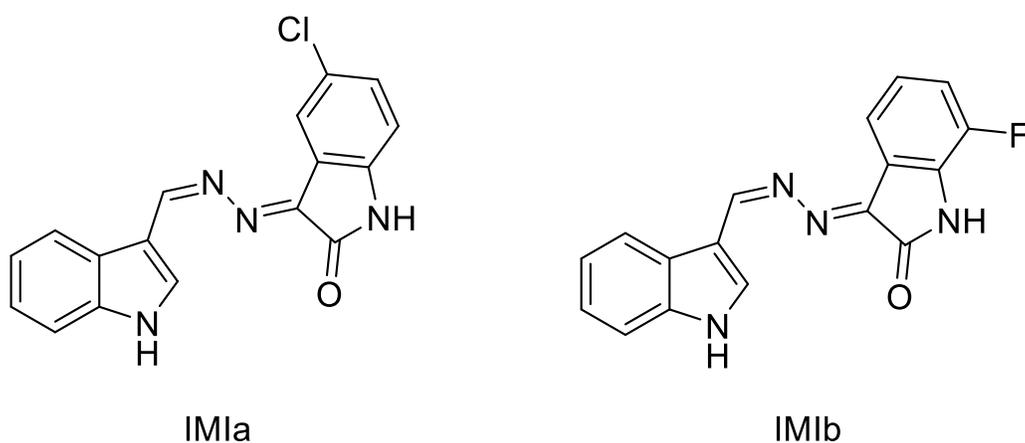


Figura 13. Estructura química de los derivados IMIa e IMIb sintetizados por Eldehna et al. en 2018.

El perfil de actividad biológica del compuesto IMIb se exploró con mayor detalle con el objetivo de indagar en los posibles mecanismos de sus efectos anticancerígenos. Luego de un análisis del ciclo celular y de inducción de apoptosis sobre la línea celular MCF-7, el compuesto IMIb demostró que era capaz de arrestar el ciclo celular en la fase G2/M e inducir un aumento marcado de 19 veces el número células apoptóticas con respecto a los controles. Además, se observaron aumentos de 76 y 380 veces los niveles de caspasa 3 y Bax, respectivamente, en las células tratadas con IMIb con respecto a las células control, indicando que el mecanismo apoptótico transcurre por la vía intrínseca⁹².

CAPÍTULO III

3.1 Justificación

La promiscuidad molecular es un enfoque relativamente reciente de la química medicinal, y su aplicación en el diseño de fármacos antineoplásicos lo es aún más. Sin embargo, debido a su capacidad de modular el microambiente tumoral y ejercer efectos anticancerígenos por mecanismos no citotóxicos, los fármacos promiscuos podrían ser utilizados como una alternativa prometedora en el tratamiento del cáncer. Por esto, y debido a los problemas que enfrenta la terapia antineoplásica actual y a las cifras alarmantes de incidencia y mortalidad de esta patología a nivel mundial y nacional, se decidió tomar en cuenta los distintos antecedentes de la actividad anticancerígena de la isatina, el indol-3-carbinol, la p-toluensulfonamida, e híbridos donde estos farmacóforos se han incorporado, con el objetivo de diseñar, sintetizar, purificar y evaluar híbridos basados en isatina con características de indol-3-carbinol o p-toluensulfonamida.

3.2 Hipótesis

Al menos un híbrido de isatina exhibirá una mayor actividad anticancerígena y mejor selectividad que el fármaco de referencia lapatinib en dos líneas celulares inmortalizadas y una no inmortalizada, respectivamente.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Llevar a cabo el diseño computacional, síntesis química, caracterización estructural, y evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica *in vitro* de compuestos híbridos de isatina.

3.3.2 Objetivos específicos

- Diseñar los híbridos de isatina mediante un análisis computacional utilizando diversas dianas moleculares de importancia en la terapia contra el cáncer.
- Sintetizar los híbridos de isatina.
- Caracterizar las moléculas sintetizadas mediante métodos espectroscópicos.
- Evaluar la actividad anticancerígena de los híbridos en las líneas celulares MCF-7 y PC-3 mediante un ensayo de viabilidad celular usando lapatinib como control positivo.
- Evaluar la citotoxicidad de los híbridos en la línea celular VERO mediante un ensayo de viabilidad celular.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

Los materiales utilizados en el proyecto se pueden dividir en tres grandes categorías. Estas se muestran a continuación en las siguientes tablas, y se mencionan los materiales con su respectiva aplicación.

Tabla 1. Materiales para el diseño computacional de los híbridos de isatina.

Nombre	Aplicación
Autodock 4.2	Software dirigido al diseño de acoplamientos moleculares entre una diana (de origen proteico, generalmente) y un ligando de interés.
Autodock Vina	Software dirigido al diseño de acoplamientos moleculares entre una diana (de origen proteico, generalmente) y un ligando de interés.
Avogadro	Software dirigido a la visualización y edición de moléculas en tres dimensiones. Sus herramientas permiten optimizar la geometría de una molécula hasta su conformación más estable.
Python	Software dirigido a la visualización y edición de macromoléculas en tres dimensiones. Sus

	herramientas permiten remover los contaminantes o ligandos presentes en los archivos del Protein Data Bank.
--	---

Tabla 2. Materiales para la síntesis química de los híbridos de isatina.

Nombre	Aplicación
Matraz bola de una boca	Síntesis química
Condensador de Allihn	Síntesis química
Termómetro	Síntesis química
Agitador magnético	Síntesis química
Agitador de vidrio	Síntesis química
Probeta	Síntesis química y purificación
Cromatofolios de sílica gel	Síntesis química y purificación
Cuba cromatográfica	Síntesis química y purificación
Embudo de extracción	Purificación
Pipeta Pasteur	Purificación
Columna cromatográfica	Purificación
Tubos de ensayo	Purificación
Vaso de precipitados	Purificación

Tabla 3. Materiales para la evaluación biológica.

Nombre	Aplicación
Frascos de células	Cultivo de células

Pipetas Pasteur	Cultivo de células y ensayos de citotoxicidad
Micropipetas de 1 mL, 200 μ L y 20 μ L	Cultivo de células y ensayos de citotoxicidad
Puntillas para micropipetas de 1 mL, 200 μ L y 20 μ L	Cultivo de células y ensayos de citotoxicidad
Tubos Falcon de 15 mL	Cultivo de células y ensayos de citotoxicidad
Combitips	Ensayos de citotoxicidad
Dispensador de Combitips	Ensayos de citotoxicidad
Placas de 96 pocillos	Ensayos de citotoxicidad
Tubos Eppendorf de 1.5 mL	Ensayos de citotoxicidad
Cámara de Neubauer	Ensayos de citotoxicidad

4.2 Reactivos

Los reactivos utilizados en el proyecto se pueden dividir en dos grandes categorías. Estas se muestran a continuación en las siguientes tablas, y se mencionan los reactivos con su respectiva aplicación.

Tabla 4. Reactivos para la síntesis química de los híbridos de isatina.

Nombre	Aplicación
Isatina	Síntesis química
6-Cloroisatina	Síntesis química

5-Metoxiisatina	Síntesis química
6-Isopropilisatina	Síntesis química
Hidrazina monohidratada al 65% en agua	Síntesis química
p-Toluensulfonilhidrazida	Síntesis química
Metanol	Síntesis química y purificación
Acetato de etilo	Síntesis química y purificación
Hexano	Síntesis química y purificación
Acetona	Purificación
Éter etílico	Purificación
Tolueno	Purificación
Sílica gel	Purificación
Sulfato de sodio	Purificación

Tabla 5. Reactivos para la evaluación biológica de los híbridos de isatina.

Nombre	Aplicación
Suero fetal bovino	Cultivo de células
Medio EMEM	Cultivo de células
Medio RPMI 1640	Cultivo de células
WST-1	Ensayos de citotoxicidad

4.3 Equipos y ubicación

Los equipos utilizados en el proyecto se pueden dividir en dos grandes categorías. Estas se muestran a continuación en las siguientes tablas, y se mencionan los equipos con su respectiva aplicación y ubicación.

Tabla 6. Equipos para la síntesis química de los híbridos de isatina.

Nombre	Aplicación	Ubicación
Rotaevaporador	Síntesis química	Laboratorio de Biofarmacia, CELAES, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.
Lámpara de UV – Vis	Síntesis química y purificación	Laboratorio de Biofarmacia, CELAES, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.
Plancha de calentamiento	Síntesis química y purificación	Laboratorio de Biofarmacia, CELAES, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.
Balanza analítica	Síntesis química y purificación	Laboratorio de Biofarmacia, CELAES, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

Campana de humos	Síntesis química y purificación	Laboratorio de Biofarmacia, CELAES, Facultad de Ciencias Químicas, UANL.
------------------	---------------------------------	--

Tabla 7. Equipos para la evaluación biológica de los híbridos de isatina

Nombre	Aplicación	Ubicación
pHmetro	Cultivo de células	Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, División de estudios de Posgrado FCQ, UANL.
Centrífuga	Cultivo de células y ensayos de citotoxicidad	Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, División de estudios de Posgrado FCQ, UANL.
Incubadora de CO ₂	Cultivo de células y ensayos de citotoxicidad	Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, División de estudios de Posgrado FCQ, UANL.
Lector de placa de ELISA	Ensayos de citotoxicidad	Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, División de estudios de Posgrado FCQ, UANL.

4.4 Metodología

La metodología general del proyecto consistió en diseñar diferentes derivados estructurales de la isatina mediante métodos computacionales. Posteriormente, sintetizar, purificar y caracterizar las estructuras que mostraran los mejores parámetros computacionales partiendo de la isatina. Finalmente, evaluar estas moléculas mediante un ensayo de citotoxicidad contra dos líneas celulares inmortalizadas de cáncer, una de cáncer de mama (MCF-7) y una de cáncer de próstata (PC-3), y una línea celular no inmortalizada (VERO). Este proceso general se dividió en cuatro etapas específicas. A continuación, se describe en que consiste cada una de ellas.

4.4.1 Diseño y análisis computacional de los híbridos de isatina

El diseño y análisis computacional de los híbridos de isatina consistió en cinco etapas: 1) el diseño de los híbridos de isatina en base a los antecedentes, 2) la predicción de dianas moleculares de los híbridos diseñados, 3) el acoplamiento molecular de los compuestos sobre las dianas moleculares identificadas en la segunda etapa y en los antecedentes, 4) el modelado molecular de los híbridos de isatina sobre las dianas moleculares, y 5) la estimación de las propiedades farmacocinéticas de los compuestos. A continuación, se describe cada etapa detalladamente.

1) Diseño de los híbridos de isatina

En el presente proyecto se pretendió adoptar el enfoque de la promiscuidad farmacológica y diseñar moléculas que presentaran un efecto anticancerígeno a través de la inhibición inespecífica de múltiples dianas moleculares.

Las moléculas híbridas se diseñaron tomando como base las estructuras de la isatina y el indol-3-carbinol, ya que, según los antecedentes, estas son moléculas que han mostrado promiscuidad molecular hacia distintas dianas moleculares de importancia en la terapia contra el cáncer, principalmente proteínas implicadas en la señalización celular como cinasas.

El diseño consistió en generar moléculas que conservaran la estructura general de la isatina y se hicieran pequeñas modificaciones encaminadas a añadir carácter del indol-3-carbinol a esta. Para este diseño se tomó en cuenta a las interacciones no covalentes que ambas moléculas pueden generar, la distancia de enlace de los átomos y, la geometría y superficie de las moléculas. Bajo estos criterios estructurales y funcionales se diseñó una plataforma base del híbrido de isatina-indol-3-carbinol, al cual se le asignó la clave B-01. A partir de la plataforma B-01 se optó por derivatizar esta estructura al añadir grupos electroattractores (radical cloro) o electrodonadores (radical isopropilo o metoxilo) con el objetivo de generar diferentes derivados y analizar su actividad biológica. A estas moléculas derivadas de B-01 se les asignó la clave B-02, B-03 y B-04, respectivamente (véase la figura 23).

Posteriormente, se decidió añadir una porción estructuralmente similar a la bencenosulfonamida que se conectara con las modificaciones a la estructura de isatina de B-01 con el objetivo de generar otra plataforma híbrida, en este caso, isatina-bencenosulfonamida. A esta molécula híbrida isatina-bencenosulfonamida se le designó la clave B-05. De la misma manera que con la plataforma B-01, se añadieron los mismos grupos electroattractores y electrodonadores a la plataforma B-05 para derivatizarla y observar los efectos de la estructura sobre su actividad biológica. A los derivados de B-05 a los que se les incorporó el radical cloro, isopropilo y metoxilo se les asignó la clave B-06, B-07 y B-08, respectivamente (véase la figura 24). La decisión de introducir el farmacóforo de bencenosulfonamida se justificó con los hallazgos de actividad biológica de los compuestos reportados por Bramson *et al.* en los antecedentes.⁸⁸

Finalmente, se decidió diseñar una plataforma híbrida de isatina simétrica utilizando hidrazina como ligante entre los dos heterociclos. A esta molécula se le asignó la clave B-09 (véase la figura 25). Y su diseño se inspiró en las moléculas patentadas por Hassan *et al.* dirigidas a células cancerígenas que expresan glucoproteína P.

En cada serie de plataformas, B-01, B-05 y B-09, se decidió mantener una estructura promiscua a pesar de las modificaciones. En el caso de B-01, mantener a la isatina y al indol-3-carbinol; en el caso de B-05 mantener a la isatina y a la bencenosulfonamida; y en el caso de B-09 mantener a la isatina, al estar en forma dimérica.

2) Predicción de dianas moleculares de los híbridos de isatina

Una vez diseñados los híbridos de isatina se prosiguió a analizar las posibles dianas moleculares a las que estos podrían unirse. Para llevar a cabo esta tarea se empleó la herramienta SwissTargetPrediction de la base de datos del Instituto de Bioinformática Suizo (SIB, por sus siglas en inglés) (véase la figura 14).⁹³

Al acceder al portal de la herramienta bioinformática se introdujeron las ocho estructuras diseñadas una a una en el cuadro de dibujo, y se recolectó su código SMILES, una nomenclatura de estructuras químicas utilizada en bioinformática que consiste en el uso de caracteres alfanuméricos para representar a una molécula. Una vez dibujada cada estructurada, se seleccionó la búsqueda de dianas para la especie *Homo sapiens* y se inició el proceso. Los resultados se recolectaron, se analizaron y, finalmente, se compararon con los resultados esperados con base en la literatura.

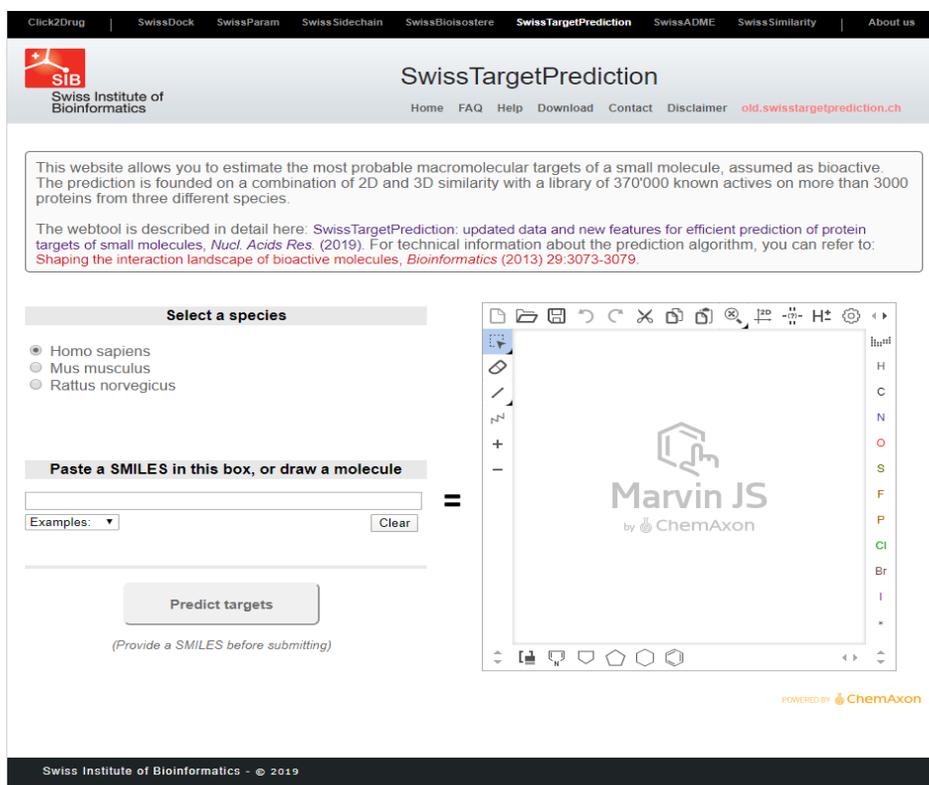


Figura 14. Interfaz de la herramienta SwissTargetPrediction del Instituto Suizo de Bioinformática. Con esta herramienta se llevó a cabo la predicción de dianas moleculares de los híbridos de isatina diseñados.

3) Acoplamiento molecular de los híbridos de isatina

El análisis de acoplamiento molecular inició con la generación de las estructuras de los híbridos de isatina en 3D. Para llevar a cabo esta tarea se empleó Avogadro, un software utilizado para dibujar y visualizar estructuras químicas en 3D y que, a través de herramientas de dinámica molecular y minimización de energía es capaz de generar una estructura química en su conformación más estable o de más baja energía. Las estructuras de los híbridos se introdujeron en el software una por una, se sometieron a las herramientas de este para minimizar su energía y obtener su

conformación más estable, y esta última se guardó en formato .pdb (véase la figura 15).⁹⁴

Posteriormente, mediante el uso de PyMOL, un software para visualizar y editar estructuras de proteínas cristalizadas, se realizó un curado de las proteínas (obtenidas del Protein Data Bank) que se iban a emplear para el acoplamiento molecular. En este curado de las estructuras se eliminaron moléculas de agua, ligandos que se cristalizaron con la proteína, e iones que no se consideren cofactores de esta. Luego de este tratamiento informático, los archivos se guardaron en formato .pdb.⁹⁵ Entre las proteínas que se incluyeron en esta etapa se encontraban las de los resultados obtenidos por SwissTargetPrediction y de la literatura para los híbridos de isatina y moléculas similares, respectivamente (véase la figura 15).

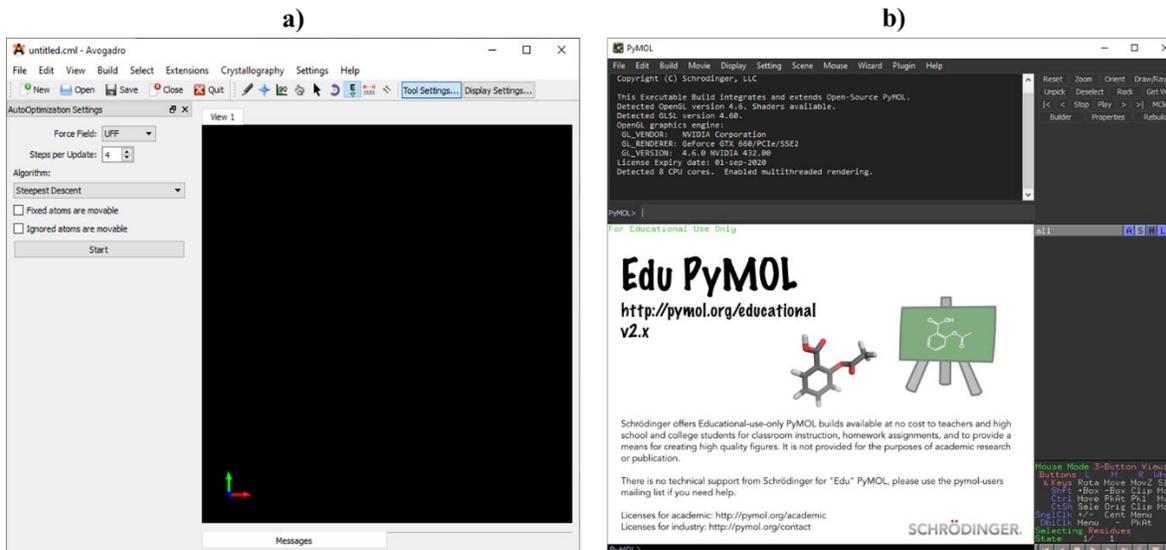


Figura 15. a) Interfaz del software Avogadro utilizado para la creación de las estructuras 3D de los híbridos de isatina. b) Interfaz del software PyMOL utilizado en la visualización y edición de proteínas.

Continuando con el proceso, se tomó una proteína tratada, y la estructura en 3D de un híbrido de isatina, y ambos se introdujeron en el software AutoDockTools para realizar el acoplamiento molecular. Primero se importó la proteína y, en automático, el programa retira los hidrógenos no polares, resalta los hidrógenos polares y añade las cargas formales a los átomos que lo requieran. Luego de esto, el software nos invitó a guardar el archivo de la proteína en formato .pdbqt luego de añadirle estas características. El ligando, es decir, el híbrido de isatina sufre el mismo proceso luego de añadirlo al software, con la característica adicional de que se establecen los enlaces rotacionales en la molécula. De la misma manera, el software nos invitó a guardar el archivo del ligando en el mismo formato. Dentro de AutoDockTools se seleccionó la herramienta GridBox (presente en la pestaña Grid) con el objetivo de delimitar el espacio en la proteína sobre el cual se pretendía realizar el acoplamiento

molecular. Este espacio de la GridBox se asigna en función de dos parámetros: 1) tamaño de la caja espacial en angstroms y 2) coordenadas de esta en los planos X, Y y Z. Estos parámetros se guardaron dentro del software, se eligió a la proteína y al ligando de interés para ejecutar el acoplamiento molecular en la pestaña de Docking, seleccionando las opciones Macromolecule y Ligand, respectivamente. Los parámetros de búsqueda se mantuvieron de forma predeterminada y se seleccionó el algoritmo genético lamarckiano como método de búsqueda para encontrar los complejos proteína-ligando con menor energía libre de Gibbs. Se inició el proceso en la pestaña de Run al seleccionar la opción Run AutoDock. Finalmente, los resultados se visualizaron en la pestaña Analyze, seleccionando la opción Dockings y, a su vez, seleccionado la opción Open. Este proceso se repitió para cada pareja proteína-ligando, y de cada resultado se generó un archivo .pdb del complejo proteína-ligando con la energía libre de Gibbs más baja. En la siguiente imagen se muestra la interfaz de AutoDockTools, donde se llevaron a cabo los pasos que se acaban de mencionar (véase la figura 16).^{96,97}

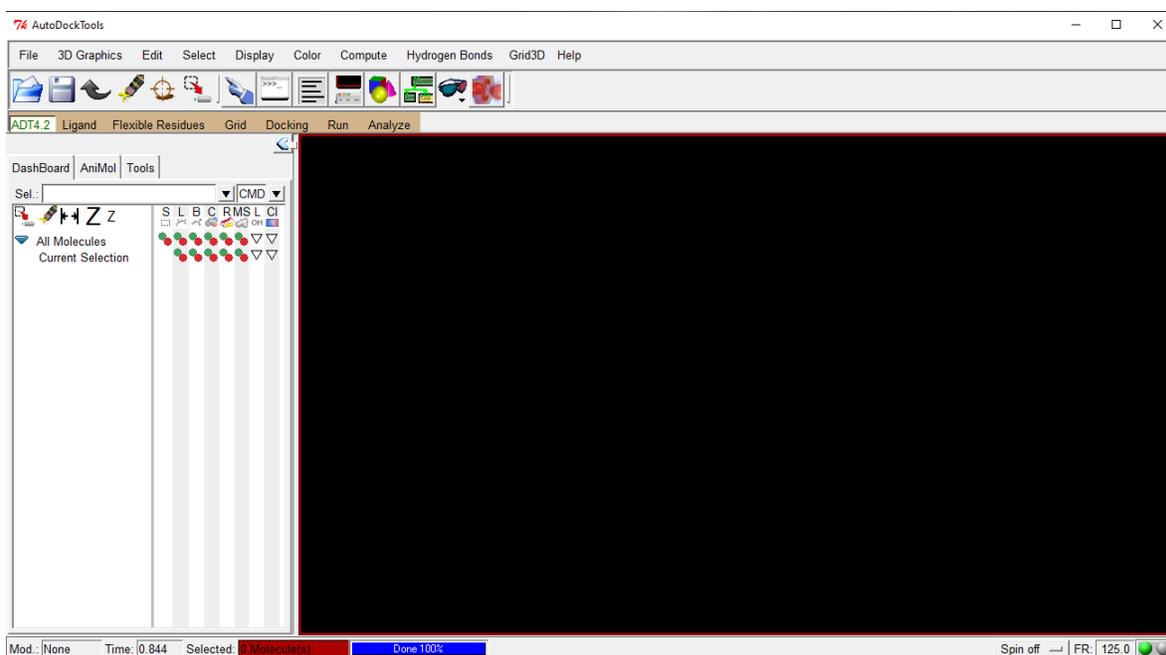


Figura 16. Interfaz del software AutoDockTools. Este software fue utilizado para llevar a cabo el acoplamiento molecular entre los híbridos de isatina y las proteínas seleccionadas.

4) Modelado molecular de los híbridos de isatina

Utilizando los archivos .pdb de los complejos proteína-ligando de menor energía libre de Gibbs que se obtuvieron en la etapa previa, se llevó a cabo el modelado molecular utilizando los softwares UCSF Chimera y LigPlot+. Esta etapa permitió analizar de manera más íntima las interacciones efectivas que se establecieron entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácido de las diferentes proteínas y los grupos funcionales de los diferentes ligandos.

Esta etapa inició al introducir un archivo .pdb de un complejo proteína-ligando en el software UCSF Chimera. Posteriormente, se seleccionó al ligando y en la pestaña de Select se eligió la opción de selección por zona que permite seleccionar todos

los átomos que se encuentren alrededor de una cierta distancia establecida. En este caso, se utilizó una distancia de 5 Å, ya que, según la literatura, aún puede existir el entablamiento de interacciones no covalentes (véase la figura 17).

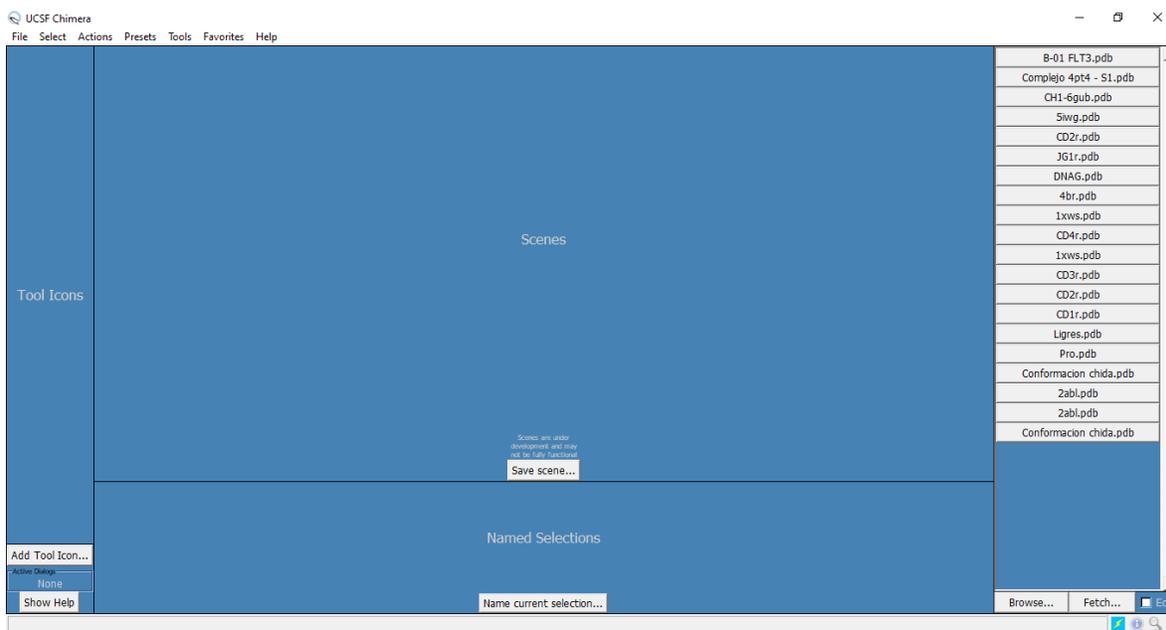


Figura 17. Interfaz del software UCSF Chimera. Este software fue utilizado para llevar a cabo el modelado molecular en 3D de los resultados del acoplamiento molecular.

Por ejemplo, los radios de Van der Waals óptimos para la formación de enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals fueron de 2.5 Å, 2.6 Å y 2.7 Å, respectivamente, siendo este mismo orden, el de las interacciones más fuertes termodinámicamente hablando. En la figura 18 se muestra esta relación de manera gráfica.

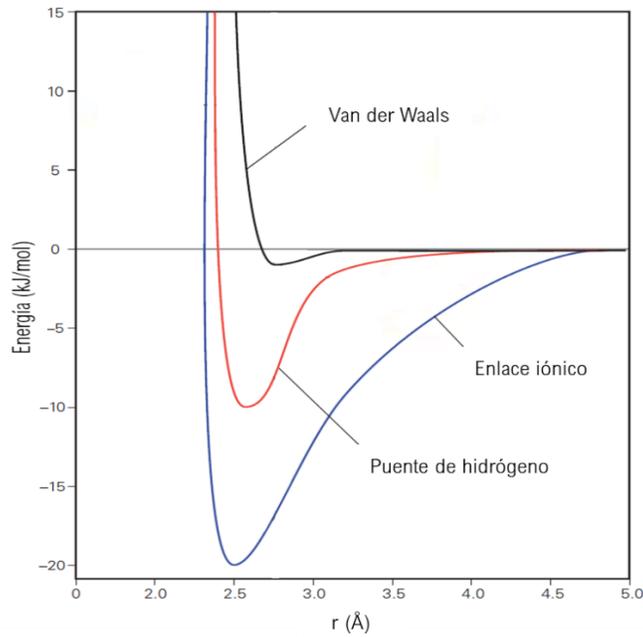


Figura 18. Relación entre la distancia de dos partículas (Å) que interactúan por fuerzas de Van der Waals (negro), puentes de hidrógeno (rojo) o enlaces iónicos (azul) y la energía liberada por esta interacción (kJ/mol).

Una vez seleccionada esta zona de 5 Å, se seleccionó la pestaña Actions y se activó la opción Show side chains only. Esta opción nos permitió visualizar todas las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que interactuaron con el ligando en cuestión. Por último, se seleccionó la pestaña Tools y se eligió la opción FindHBond del programa que permite identificar los puentes de hidrógeno potenciales que se pueden establecer, tomando en cuenta a los átomos involucrados y criterios geométricos.

Este modelado en 3D se simplificó utilizando un software de interacciones proteína-ligando conocido como LigPlot+. Este software es capaz de generar una imagen en 2D a partir del archivo 3D del complejo proteína-ligando en cuestión. Esto permite

una mejor visualización de las interacciones, y de los átomos involucrados en estas. Para iniciar esta conversión se seleccionó la pestaña File, y posteriormente la opción PDB file. Luego de haber seleccionado un archivo .pdb correspondiente a un complejo proteína-ligando, se prosiguió a seleccionar el botón Run en la ventana principal. Los diagramas en 2D que se obtuvieron se guardaron y analizaron junto con las imágenes en 3D obtenidas de UCSF Chimera. En la figura 19 se puede apreciar la interfaz y un diagrama en 2D de LigPlot+ como ejemplo.

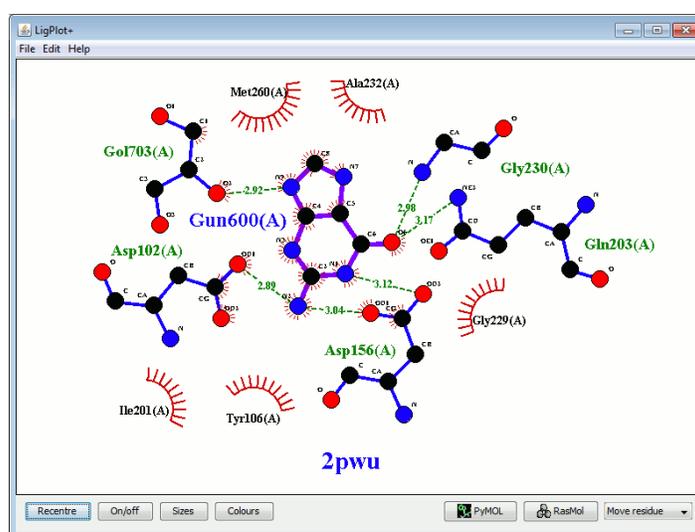


Figura 19. Interfaz del software LigPlot+. En este software se llevó a cabo el modelado molecular en 2D de los resultados del acoplamiento molecular.

Estos dos procedimientos se repitieron con todos los complejos proteína-ligando que se generaron en la etapa anterior.

5) Estimación de las propiedades farmacocinéticas de los híbridos de isatina

En esta última etapa se accedió a la herramienta SwissADME perteneciente al SIB, con el objetivo de obtener un perfil farmacocinético estimado de los ligandos que se

diseñaron y determinar el carácter “druglikeness”. Este carácter cualitativo se compone de todos aquellos atributos de una molécula que le otorgan parámetros deseados relacionados con la biodisponibilidad. En la figura 20 se muestra la interfaz de la base de datos de Swiss ADME.

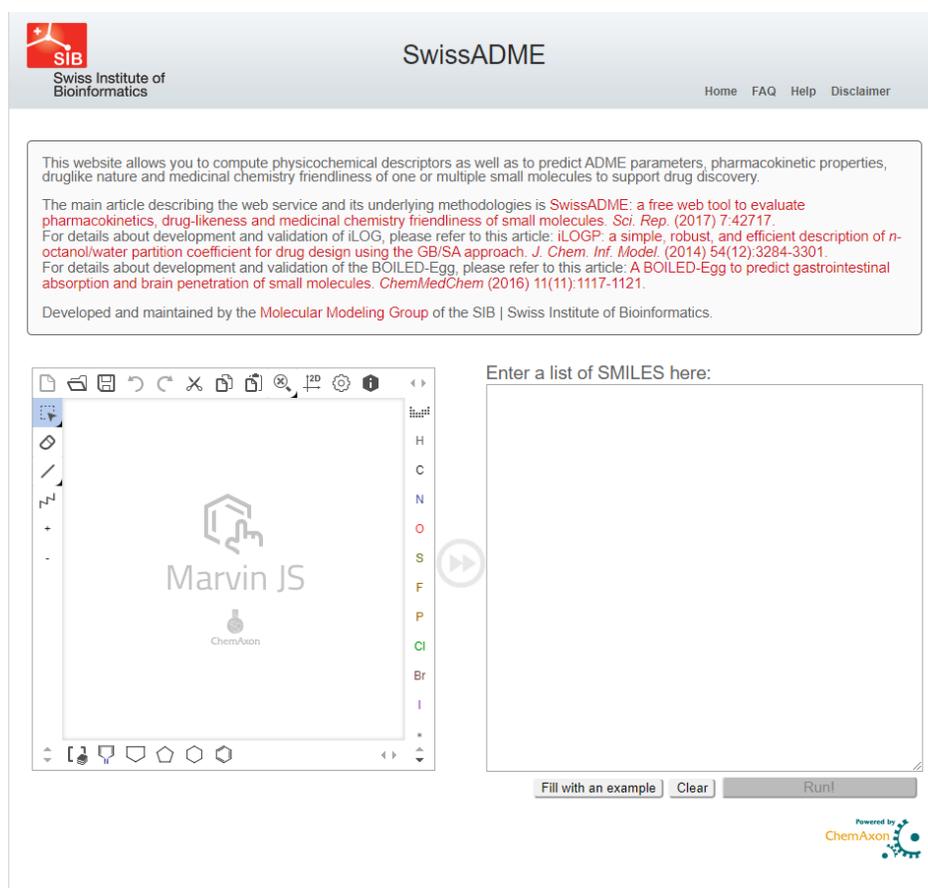


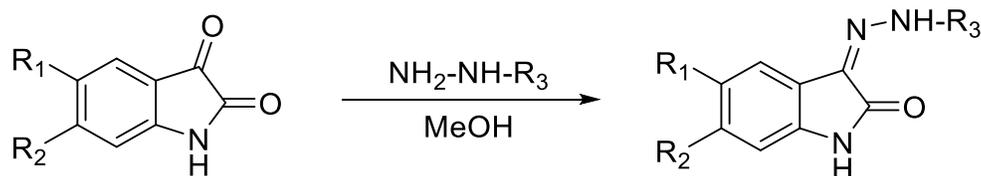
Figura 20. Interfaz de la herramienta SwissADME del Instituto Suizo de Bioinformática. En esta herramienta se llevaron a cabo las predicciones de los parámetros farmacocinéticos de los híbridos de isatina diseñados.

Al entrar en la base de datos del SwissADME se introdujeron las estructuras de los híbridos de isatina, uno por uno, utilizando los SMILES generados correspondientes a cada molécula. Posteriormente, se seleccionó la opción Run y se inició el proceso.

Los resultados se recolectaron en una base de datos de Excel, y finalmente se analizaron para integrar estos datos con los obtenidos en las etapas previas.

4.4.2 Síntesis química de los híbridos de isatina

Para sintetizar los derivados de isatina que se plantearon en el punto anterior se llevó a cabo una reacción de formación de iminas. El esquema de reacción general se muestra a continuación en el esquema 1.



Esquema 1. Reacción de formación de iminas utilizada para la síntesis de los híbridos de isatina. En la estructura de la isatina (izquierda) los radicales pueden ser los siguientes. R₁: -OCH₃ y R₂: -CH(CH₃)₂ o -Cl. En la estructura de la hidrazina (flecha) el radical puede ser R₃: -H o -SO₂(C₆H₄)CH₃.

El procedimiento para la reacción de formación de iminas comenzó con la adición de 1 equivalente de isatina a un matraz bola de una boca. Se añadió metanol como solvente en una razón de 3 mL por cada 500 mg de isatina. La solución de isatina en metanol se colocó en una plancha de calentamiento (a temperatura ambiente) y se puso en agitación con un agitador magnético por 20 minutos. Posteriormente, se añadieron los equivalentes de hidrazina monohidratada (o p-toluensulfonilhidrazida, según sea el caso), se colocó el condensador para adaptar la reacción a reflujo, y

se elevó la temperatura hasta 65 °C. Los equivalentes de la hidrazina o la hidrazida estuvieron sujetos a prueba para identificar la relación mínima que generara el mejor rendimiento de reacción. Todas las reacciones se monitorearon mediante cromatografía en capa fina.

Una vez finalizada la reacción, se dismanteló el equipo de reflujo, y la mezcla de reacción se llevó a refrigeración por al menos una hora. Esto disminuyó la solubilidad del producto en el metanol aún más, y aumentó la recuperación en los pasos posteriores.

La purificación de las mezclas de reacción se llevó a cabo mediante una filtración a vacío, un lavado con metanol y una recristalización. El proceso de purificación comenzó con una filtración a vacío de la mezcla de reacción refrigerada utilizando metanol frío para lavar el sólido retenido en el filtro. Una vez finalizada esta etapa de lavado, el papel filtro con el sólido se colocó en una estufa de secado a una temperatura de 65 °C, con el objetivo de evaporar el metanol y secar el sólido.

A partir de este punto, se inició el proceso de recristalización, con el objetivo de retirar las impurezas restantes y obtener cristales de los productos. La recristalización inició cuando el sólido estuvo completamente seco. Este se colocó en un vaso de precipitados (previamente tarado) y se registró el peso. Se añadió una cantidad inicial de 10 mL del solvente seleccionado al vaso de precipitados con el sólido, se colocó en la plancha de calentamiento, y se llevó la temperatura hasta la ebullición. De manera progresiva, se añadieron pequeñas porciones del solvente seleccionado al vaso de precipitados hasta llegar al volumen mínimo para disolver

completamente al sólido. Finalmente, esta solución se retiró de la plancha y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la recristalización, los cristales se filtraron mediante una filtración a vacío empleando un embudo Büchner. Los cristales retenidos por el filtro se lavaron utilizando metanol frío, como en la etapa previa. Finalmente, el papel filtro con los cristales se secaron utilizando una estufa de secado a 65 °C. Una vez seco el producto, este se colocó en un vial tarado previamente y se registró el peso. Finalmente se calculó la diferencia entre el peso del vial con el producto y el peso del vial tarado para obtener la cantidad de producto final.

4.4.3 Caracterización estructural de los híbridos de Isatina

Una vez obtenidos los seis derivados de isatina, estos se sometieron a diferentes técnicas espectroscópicas con el objetivo de confirmar la estructura química que se esperaba obtener de las reacciones.

La caracterización estructural se llevó a cabo mediante cuatro técnicas instrumentales: 1) espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H), 2) espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN-¹³C), 3) análisis elemental, y 4) espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). A continuación, se describirán las consideraciones que se tomaron en cuenta para llevar a cabo estas técnicas y la información que se pretende obtener.

1) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear ¹H

Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron entre 5 y 6 mg de los diferentes derivados de isatina que se sintetizaron. Además, para correr los espectros de RMN-¹H se utilizó como solvente el dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), ya que era el único solvente capaz de disolverlos sin aplicar una temperatura elevada.

Una vez obtenidos los archivos FID del equipo, estos se procesaron utilizando el software MNova 14.1.1. donde se llevó a cabo la integración (para hidrógenos equivalentes), la determinación de las constantes de acoplamiento, la determinación de la multiplicidad y la determinación de los desplazamientos químicos de las señales de cada espectro de RMN-¹H.

La determinación de las constantes de acoplamiento para una señal se llevó a cabo mediante la resta de los desplazamientos entre dos picos de un multiplete dado, esta diferencia posteriormente es multiplicada por 400 Hz (la potencia del equipo). Cabe mencionar que este cálculo solo se puede llevar a cabo en una señal que presente una multiplicidad mayor de 1 (o de singulete). Para calcular la multiplicidad de una señal, se debe seguir la regla aritmética N+1, donde N representa el número de hidrógenos vecinos del protón que generó la señal. En una señal donde no haya hidrógenos vecinos a un protón, este último presentará una multiplicidad de 1 o de singulete.

2) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear ¹³C

Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron entre 6 y 10 mg de los diferentes derivados de isatina que se sintetizaron. De la misma manera que para la RMN-¹H,

para correr los espectros de RMN-¹³C se utilizó como solvente el DMSO-d₆, ya que era el único solvente capaz de disolverlos sin aplicar una temperatura elevada.

Una vez obtenidos los archivos FID del equipo, estos se procesaron utilizando el software MNova 14.1.1. donde se llevó a cabo la integración (para carbonos equivalentes) y la determinación de los desplazamientos químicos de las señales de cada espectro de RMN-¹³C. La determinación de las constantes de acoplamiento y la multiplicidad no se llevó a cabo en este tipo de espectros, esta última solo para justificar la presencia de señales ajenas al compuesto de interés.

4.4.4 Evaluación de citotoxicidad de los híbridos de isatina

La evaluación citotóxica de los derivados de isatina se llevó a cabo en tres líneas celulares diferentes, una línea celular no inmortalizada (VERO) y dos líneas celulares inmortalizadas (PC-3 y MCF-7). El método empleado para la evaluación citotóxica fue el ensayo colorimétrico con WST1.

El ensayo colorimétrico con WST1 se fundamenta en la reducción química de la sal de sodio del 4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno (WST1) a formazan por acción del metabolismo de una célula viable, específicamente por la actividad de la succinato reductasa de la cadena transportadora de electrones. La sal sódica de WST1 disuelta presenta un color rojo claro, luego de la reducción mencionada anteriormente, la solución se torna de un color rojo oscuro, esto debido a la generación de formazan que presenta una absorción máxima a 440 nm. Este cambio de color se utiliza para determinar el número de células viables de una población de células que se sometió a un

tratamiento en particular, en este caso, la exposición a los derivados de isatina. Debido a que solo las células viables pueden llevar a cabo la reducción del WST1 a formazan, una mayor absorbancia indicará una mayor viabilidad celular, por el contrario, una menor absorbancia indicará una menor viabilidad celular, e indirectamente, mayor muerte celular.^{98,99} El procedimiento de los ensayos de citotoxicidad se puede dividir en cuatro etapas: 1) Cultivo de células, 2) Preparación de placas de 96 pocillos, 3) Adición de compuestos a la placa, y 4) Adición del WST1 y lectura de la placa. A continuación, se describe el procedimiento de cada etapa de manera detallada.

1) Cultivo de células

Las células se cultivaron utilizando frascos de células de 25 mL y su respectivo medio celular. Para las líneas celulares VERO y MCF-7 se utilizó el medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) y para la línea celular PC-3 se utilizó el medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640). Cada cultivo de células inició con un pase entre frascos. En estos pases se partía de un frasco de células con una confluencia de entre el 70% y 80%. Una vez el frasco alcanzó esta confluencia, las células se tripsinizaron utilizando 1 mL de tripsina y se dejaron incubar a 37 °C por 6 minutos con CO₂ al 5%. Al frasco se añadió 1 mL de medio para inactivar la tripsina, y se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL. Este tubo se centrifugó a 1,300 rpm por 10 minutos obteniéndose un botón de células en el fondo. Este botón de células se resuspendió utilizando 1 mL de medio. Finalmente, se tomaron 100 µL de la suspensión y se colocaron en 2 frascos de células con 3 mL de medio cada

uno. Se decidió utilizar dos frascos de células para tener un exceso de estas y evitar problemas relacionados al número de células en la siguiente etapa.

2) Preparación de placas de 96 pocillos

El procedimiento que se siguió para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad comenzó con el cultivo de las células en un frasco de células hasta alcanzar una confluencia de entre el 70% y 80%. Una vez se alcanzó esta confluencia, las células se tripsinizaron con 1 mL de tripsina por frasco de células y se incubaron por 6 minutos a 37 °C con CO₂ al 5%. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio a la suspensión de células para inactivar la tripsina. Esta suspensión se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 1,300 rpm por 10 minutos hasta obtener un botón de células en el fondo. Utilizando una pipeta Pasteur estéril y una bomba de vacío se retiró el medio del tubo, evitando dañar el botón de células. Luego de esto, se añadieron 4 mL de medio más, y se resuspendió el botón de células utilizando una micropipeta de 1,000 µL. De la suspensión resultante, se tomaron 20 µL utilizando una micropipeta de 20 µL y se colocaron en ambas cámaras del hemocitómetro (o cámara de Neubauer). Se colocó el cubreobjetos de tal manera que abarcara ambas cámaras y se comenzó a contar en el microscopio óptico en el campo de 10x. La cuenta de células se llevó a cabo en las esquinas de cada cámara. Los valores obtenidos de cada esquina se promediaron y se multiplicaron por un factor de 10,000 correspondiente al volumen de la cámara de Neubauer. Además, este resultado se multiplicó por un factor extra de 4, correspondiente al volumen total de la suspensión de células. Mediante estos cálculos se estimó la cantidad de células presentes en 4 mL de suspensión. Sucesivamente, se hicieron los cálculos

necesarios para determinar cuántas células se necesitarían en una placa de 96 pocillos contemplando 5,000 células por pocillo y 100 μ L de medio por pocillo. Se preparó una suspensión de células nueva que considerara el volumen total de medio y el número de células necesarias para la placa a partir de la suspensión original. Finalmente, se tomó esta suspensión utilizando un combitip y se dispuso sobre cada pocillo de la placa. Esta se incubó a 37 °C por 24 horas con CO₂ al 5%.

3) Adición de compuestos a la placa

Se comenzó pesando 1 mg de cada sustancia a evaluar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 50 μ L de DMSO al 100%, estéril y libre de partículas, y se agitó el tubo hasta la disolución completa. Esta solución fungiría como la solución stock a partir de la cual se derivarían las próximas diluciones.

Para llevar a cabo la adición de los compuestos a la placa se siguieron dos metodologías, estas variaban según el propósito del ensayo.

En una metodología se pretendió llevar a cabo una evaluación general de los compuestos en cada línea celular para identificar el rango de concentración donde se encuentra la concentración inhibitoria 50 (o IC₅₀ por sus siglas en inglés) de cada compuesto. En estos ensayos la concentración máxima evaluada fue de 100 μ M, siendo esta el doble de la concentración de corte que especifica la metodología de evaluación NCI-60 (cuyo objetivo es identificar compuestos prometedores contra el cáncer). Un compuesto que presente una IC₅₀ menor de 100 μ M en una línea inmortalizada como MCF-7 o PC-3, por ejemplo, podría ser prometedor debido a su efecto citotóxico sobre células de origen tumoral. Por otro lado, un compuesto que

presente una IC₅₀ mayor de 100 µM en una línea no inmortalizada también podría ser prometedor debido a una citotoxicidad baja sobre células no tumorales.

La siguiente metodología estuvo enfocada en la determinación de la IC₅₀ de las sustancias que tuvieron un porcentaje de inhibición mayor del 50% en las células a una concentración máxima de 100 µM.

Por este motivo, la metodología de la adición de compuestos a la placa de 96 pocillos se desglosó en las siguientes dos variantes:

a) Evaluación general

A partir de las diferentes soluciones stock de cada compuesto, por medio de una dilución, se prepararon soluciones de 20,000 µM utilizando DMSO al 100%. Posteriormente, a partir de estas soluciones se prepararon soluciones de 200 µM en una dilución 1:100 utilizando medio como solvente. Finalmente, se tomaron 100 µL de cada solución de 200 µM y se diluyeron una vez más en la placa de 96 pocillos en una dilución 1:1 con los 100 µL de medio ya presentes en la placa con las células. De esta manera la concentración final de las sustancias y del DMSO fue de 100 µM y 0.5%, respectivamente. Luego de añadir los compuestos en la placa, esta se incubó a 37 °C por 24 horas con CO₂ al 5%. Cada compuesto se evaluó por cuadruplicado, y se comparó contra el control de células y de DMSO al 0.5%.

b) Determinación de IC₅₀

Para determinar el IC₅₀ de un compuesto se siguió una metodología similar a la evaluación general en lo que respecta a la preparación de las soluciones. Una vez preparada la solución de 200 µM del compuesto de interés, se tomaron 100 µL de

la solución y se llevó a cabo una dilución 1:1 con los 100 μL de medio presentes en el pocillo de la placa para generar una solución de 100 μM en el mismo. De esta solución se tomaron 100 μL y se llevó a cabo una dilución 1:1 con los 100 μL de medio presentes en el siguiente pocillo (de arriba hacia abajo en la placa) para generar una solución de 50 μM . Este proceso de dilución seriada se repitió seis veces, de tal manera que se generaron seis concentraciones descendentes (100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.125 μM) a partir de una concentración de 100 μM . Luego de añadir los compuestos en la placa, esta se incubó a 37 °C por 24 horas con CO_2 al 5%. Cada concentración del compuesto se evaluó por cuadruplicado, y se comparó contra el control de células, el control de DMSO al 0.5%, y el control positivo lapatinib, que se evaluó en las mismas condiciones y a las mismas concentraciones seriadas en las distintas líneas celulares (partiendo de 100 μM o 50 μM , según sea el caso) para determinar su IC_{50} .

4) Adición del WST1 y lectura de la placa

La adición del WST1 se llevó a cabo de la misma manera, independientemente de la metodología de adición de los compuestos a la placa. En esta metodología, primero se preparó una solución de WST1 al 5% utilizando medio como solvente. Segundo, una vez que la placa con las células y los compuestos alcanzaron las 24 horas, se retiró el medio, y todos los pocillos con células se lavaron con 100 μL de buffer de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) para eliminar la cantidad residual de los compuestos que pudiera interferir con el ensayo colorimétrico. Posteriormente, el PBS se retiró y se añadió la solución de WST1 al 5% utilizando un combitip. La placa con células y el reactivo se incubó a 37 °C por dos horas con

CO₂ al 5%. Finalmente, luego del tiempo de incubación, se determinó la absorbancia de los diferentes pocillos a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

4.4.5 Disposición de residuos

Todos los residuos generados durante la síntesis química y la evaluación biológica se dispusieron de acuerdo con los reglamentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La clasificación de residuos se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de residuos químicos y biológicos del reglamento de la FCQ.

Recipiente	Contenido
A	Soluciones salinas pH 6-8. Sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, y bases inorgánicas.
B	Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.
C	Tóxicos e inflamables, combinaciones orgánicas no halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas, disolventes orgánicos no halogenados.
D	Tóxicos e inflamables, combinaciones orgánicas halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas, disolventes orgánicos halogenados.
E inorgánico	Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.
E orgánico	Muy tóxico, cancerígeno, orgánico.
G	Combinaciones orgánicas sólidas.

H	Oxidantes
Bolsa roja	Cajas Petri, puntillas, medio de cultivo, y productos involucrados en la manipulación biológica.

Capítulo V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados y discusión del diseño y análisis computacional

5.1.1 Diseño de híbridos de isatina

La isatina y el indol-3-carbinol, ambos, son moléculas heterocíclicas que difieren solo en el ciclo de cinco miembros. Mientras que el ciclo de cinco miembros del indol-3-carbinol es aromático y está conjugado con el ciclo de seis miembros adyacente, el ciclo de cinco miembros de la isatina carece de aromaticidad. Sin embargo, la planaridad se mantiene en las dos estructuras, debido a la presencia de los dos carbonilos en el caso de la isatina. Además, en lo que respecta a los sustituyentes del anillo de cinco miembros, el indol-3-carbinol presenta un radical hidroximetilo en la posición 3 con respecto al nitrógeno indólico. Por otro lado, la isatina mantiene un sistema alfa-cetoamida en el anillo de cinco miembros. Estas diferencias estructurales y funcionales se muestran a continuación en la figura 21.

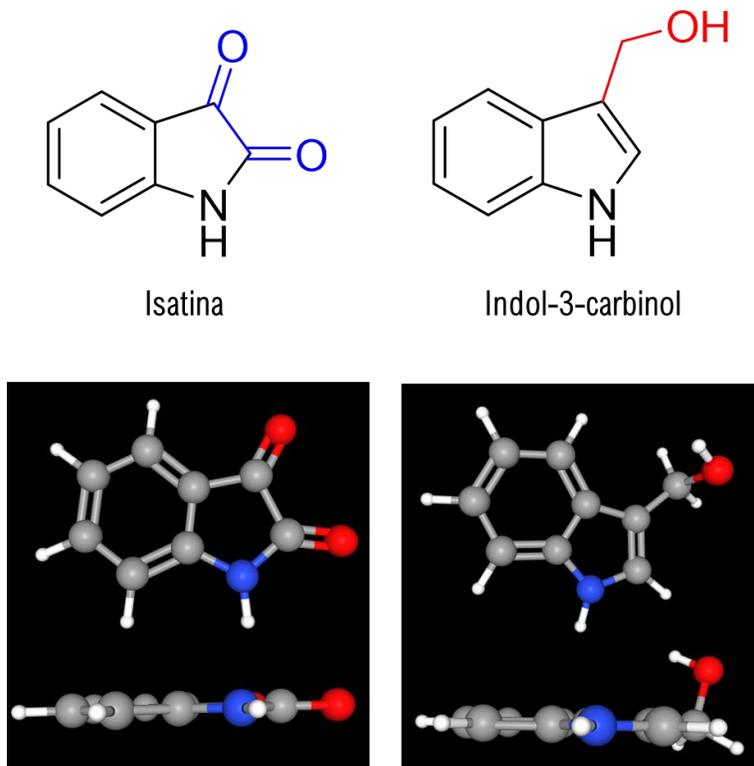


Figura 21. Estructura en 2D y 3D de la isatina (izquierda) e indol-3-carbinol (derecha) donde se remarcan las diferencias estructurales en azul y rojo, respectivamente. Se puede apreciar la planaridad de los dos heterociclos.

Para el diseño de las estructuras híbridas basadas en isatina, se optó por mantener el sistema alfa-cetoamida, pero con algunas modificaciones estructurales con el objetivo de añadir características del indol-3-carbinol a los híbridos de isatina.

El radical hidroximetilo del indol-3-carbinol tiene la capacidad de generar tres puentes de hidrógeno a través de su grupo hidroxilo, actuando como donador de dos pares de electrones y como aceptor de un par de electrones. La distancia de enlace calculada entre el carbono del metileno y el oxígeno del radical hidroximetilo es de 1.4 Å, mientras que la distancia de enlace entre el carbono 3 del anillo indólico y el carbono metilénico del radical hidroximetilo es de 1.5 Å.

Con base en las características estructurales y funcionales del radical hidroximetilo se optó por reemplazar el grupo ceto por una porción de metenilhidrazona. Hubo tres razones principales para justificar esta modificación: 1) el grupo imina presente en la porción de metenilhidrazona es un bioisostero del grupo ceto; 2) la distancia calculada entre los nitrógenos de la porción de metenilhidrazona es de 1.4 Å, el mismo valor obtenido previamente para el caso del radical hidroximetilo; y 3) el grupo amino de la porción de metenilhidrazona tiene la capacidad de formar tres puentes de hidrógeno, actuando como donador de un par de electrones y como aceptor de dos pares de electrones. A continuación, en la figura 22 se muestran las estructuras del indol-3-carbinol y la estructura general de la molécula híbrida basada en isatina con las modificaciones y los criterios estructurales y funcionales que se tomaron en cuenta para su diseño.

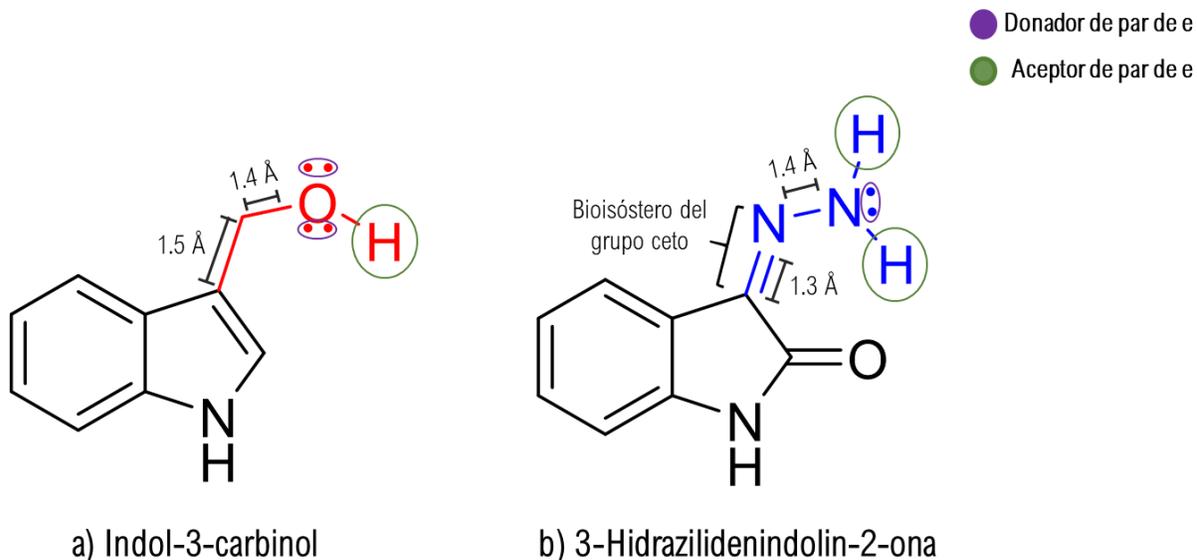


Figura 22. Se encierran en púrpura los pares de electrones que actúan como aceptores para formar puentes de hidrógeno. En verde se encierran los hidrógenos que actúan como donadores para formar puentes de hidrógeno. a) Se remarcan las distancias de enlace del radical hidroximetilo (rojo). b) Se remarcan las distancias de enlace de la hidrazona. Además, se puede observar el bioisosterismo de la hidrazona con respecto al grupo ceto de la isatina.

Como se puede observar en la imagen pasada, se reemplazó el grupo ceto de la isatina por un grupo imina. La decisión se fundamentó en la necesidad de añadir un grupo formador de puentes de hidrógeno, ya que el oxígeno del grupo ceto no es capaz de formar enlaces covalentes y sustituir el grupo ceto por otro grupo basado en oxígeno, que si pueda hacerlo implicaría perder el carácter de doble enlace y la planaridad del anillo. Por este motivo, sustituir el grupo ceto por un grupo imina permite al nitrógeno tener un enlace covalente adicional al doble enlace.

Otra característica por resaltar de la molécula híbrida es la menor distancia del enlace entre el carbono 3 del anillo de cinco miembros y el nitrógeno del grupo imina

con respecto al enlace entre el carbono 3 del anillo indólico y el carbono metilénico del radical hidroximetilo en el indol-3-carbinol, con valores respectivos de 1.3 Å y 1.5 Å. Aunque la distancia de enlace es diferente en este caso, se optó por sacrificar la similitud en la distancia de este enlace para mantener la similitud con el carácter de doble enlace presente en la isatina.

Una vez obtenida la molécula híbrida de isatina e indol-3-carbinol a la que se le designó la clave B-01, se prosiguió a diseñar derivados de esta estructura general mediante la adición de grupos electrodonadores y electroattractores con el objetivo de estudiar el efecto de las variaciones estructurales de B-01 en la actividad anticancerígena. Estas modificaciones se justificaron con base en la ausencia de radicales que presentaba el anillo de 6 miembros de B-01. Al añadir grupos electroattractores o electrodonadores a la molécula B-01 se podría mejorar la actividad anticancerígena, posiblemente a través de dos efectos: 1) una mejora en las interacciones que podrían estabilizar la estructura B-01 en los sitios de unión de la proteína blanco, y 2) un cambio en la afinidad de los derivados de B-01, de tal manera que entre estos derivados no se compartan las mismas proteínas blanco. Se diseñaron tres estructuras, estas se muestran en la figura 23 acompañadas de la clave que se les asignó.

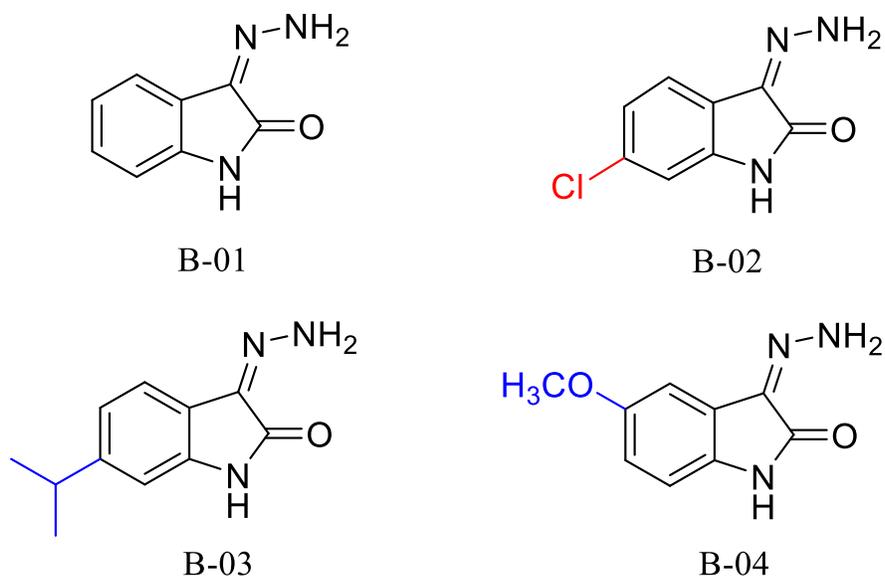


Figura 23. Estructuras químicas de los híbridos isatina-indol-3-carbinol.

Posteriormente, se decidió implementar otra modificación a estas cuatro moléculas con el objetivo de explorar aún más los efectos estructurales sobre la actividad anticancerígena. Para llevar a cabo esta modificación se tomó en cuenta la información química y biológica de la literatura sobre las arilsulfonilamidas. Así que se diseñó otra ronda de cuatro moléculas, utilizando la estructura híbrida base (B-01) y sus derivados (B-02 al B-04), a las que se les añadió una porción de p-toluenilsulfonilamida. Las moléculas resultantes se consideraron híbridos de isatina y p-toluenilsulfonamida. Las estructuras de los cuatro híbridos se muestran a continuación, en la figura 24, con la clave que se les asignó.

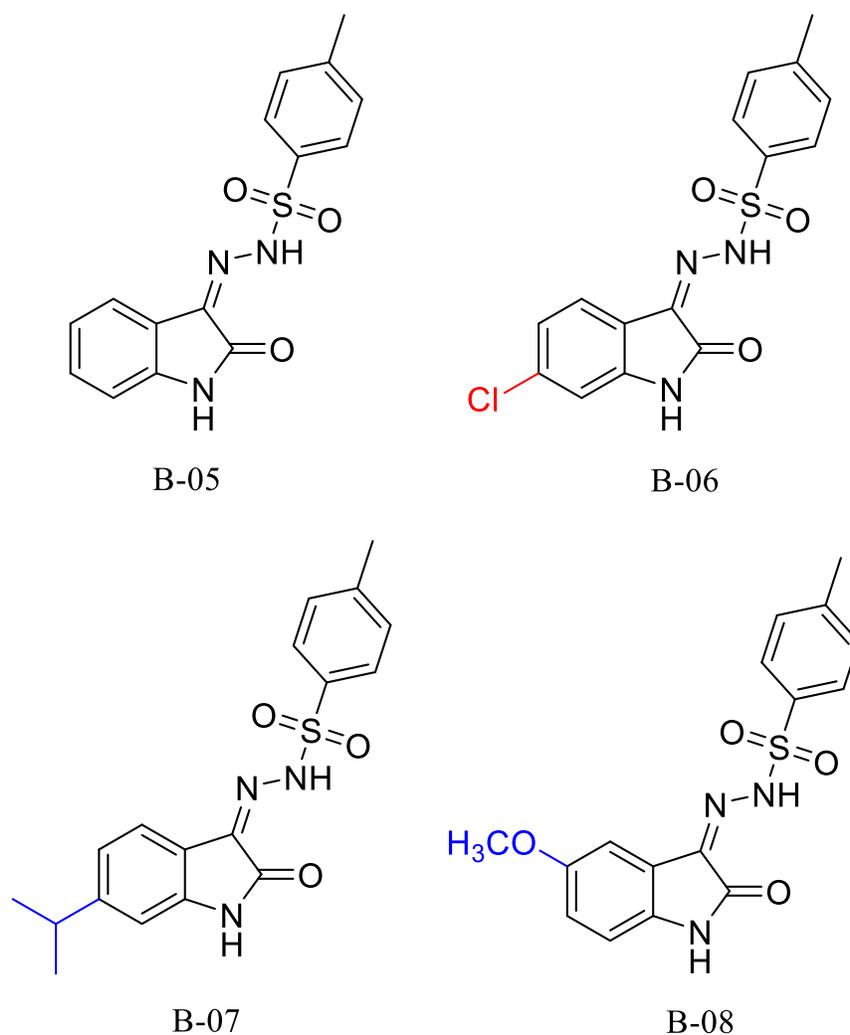


Figura 24. Estructura química de los híbridos de isatina-p-toluensulfonamida.

Finalmente, basándonos en la literatura se decidió diseñar un último híbrido de isatina (B-09) que presentará simetría y cuyo farmacóforo fuera otra porción de isatina con el objetivo de evaluar las tres plataformas base, B-01, B-05 y B-09, mediante los métodos computacionales y ensayos biológicos de citotoxicidad. La estructura química de B-09 se muestra en la figura 25.

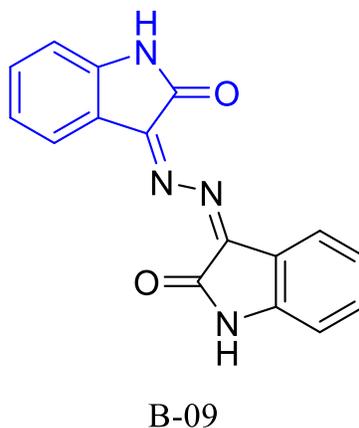


Figura 25. Estructura química del híbrido bis-isatina.

5.1.2 Predicción de dianas moleculares de los híbridos de isatina

La predicción de dianas moleculares mediante la herramienta SwissTargetPrediction nos permitió recolectar listados de posibles proteínas sobre las cuales los híbridos diseñados podrían ejercer sus efectos biológicos. Es importante mencionar que para todos los híbridos de isatina diseñados, desde el B-01 hasta el B-09, siempre se mostraron como resultados proteínas que participan en vías de señalización o el ciclo celular, especialmente del tipo cinasa. A continuación, en la tabla 8 se muestran los resultados de interés de la predicción de dianas correspondientes a la isatina, los híbridos diseñados a partir de esta, y un compuesto análogo de origen indólico (2-oxoindol).

Tabla 9. Dianas moleculares predichas por la herramienta SwissTargetPrediction para los híbridos de isatina.

Clave	Dianas moleculares predichas
B-01	Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (MET); y las Quinasas Dependientes de Ciclinas (CDK) 1 y 2.
B-02	Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos; y las Cinasas Dependientes de Ciclinas 1 y 2.
B-03	Proteína Tirosín Cinasa 2 Beta; Sirtuina Desacetilasa 2 Dependiente de NAD; Receptor del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF); Timidilato Sintasa; Esteroide 5-Alfa Reductasa 1; Complejos CDK1-Ciclina B, CDK1-Ciclina B1, y CDK2-Ciclina A; Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos; ADN Topoisomerasa II Alfa; MAP3K14 y MAP4K4; CDK1 y CDK2; Proteína Tirosín Cinasas JAK 1 y 2; y Proteína de Diferenciación Celular de Leucemia Mieloide Inducida Mcl-1 (MCL-1).
B-04	Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos; MAPK1 (ERK2) y MAPK9; Complejos CDK1-Ciclina B, CDK1-Ciclina B1, CDK2-Ciclina A; Proteína Serina/Treonina Cinasa Chk1 y 2; Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Beta (GSK-3 β); Proteína Cinasa C Alfa y Beta; Proteína Serina/Treonina Cinasa Aurora A; CDC7; CDK5; MAP3K5, MAP2K3 y MAP2K1.
B-05	Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Alfa y Beta; Telomerasa Transcriptasa Inversa (TERT); Proteína Tirosín Cinasas JAK 1, 2 y 3; Catepsina K;

	<p>CDK1, 2 y 5; Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR); Regulador apoptótico Bcl-2 (BCL2); Receptor del Factor de Crecimiento Transformante Beta Tipo 1 (TGF-β1); Elastasa Leucocitaria; MAPK 8, 9 y 14; Receptor del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina; Proteína Tirosín Kinasa ABL1; Kinasa de Adhesión Focal 1; Proteína Serina/Treonina Kinasa Aurora A; Proteína Kinasa C Alfa; Kinasa de PIP3 110 Subunidad Alfa, Beta, Gamma y Delta; Complejos CDK2-Ciclina A, CDK1-Ciclina B1, CDK7-Ciclina H, y CDK9-Ciclina T1.</p>
B-06	<p>CDK1, 2, 4 y 5; Glucógeno Sintasa Kinasa 3 Alfa y Beta; Catepsina K; Proteína Tirosín Kinasa JAK 2 y 3; BCL2; Telomerasa Transcriptasa Inversa; EGFR y ERBB2; Receptor del Factor de Crecimiento Transformante Beta Tipo 1; MAPK 8, 9, 10 y 14; Proteína Serina/Treonina Kinasa Chk1; Caspasa 3; Elastasa Leucocitaria; Complejos CDK1-Ciclina B, CDK1-Ciclina B1, CDK2-Ciclina A, CDK4-Ciclina D1, CDK7-Ciclina H, y CDK9-Ciclina T1; Proteína Tirosín Kinasa ABL1; Proteína Kinasa C Alfa; Kinasa de PIP3 110 Subunidad Alfa, Beta, y Gamma; Proteína Serina/Treonina Kinasa Aurora A; BRAF, ERBB2, FGFR1; STAT3.</p>
B-07	<p>CDK1, 2 y 5; Glucógeno Sintasa Kinasa 3 Alfa y Beta; Proteína Tirosín Kinasa JAK 1, 2 y 3; CDC7; BRAF; MAPK 8, 9 y 14; Metaloproteína de Matriz 3 (MMP3); MAP3K8; EGFR y ERBB2; Proteína Kinasa C Beta; Proteína Serina/Treonina Kinasa Pim 1 y 2; Ciclooxygenasa 1 y</p>

	2; Receptor de Estrógeno Alfa y Beta; Complejos CDK1-Ciclina B, CDK2-Ciclina A, CDK2-Ciclina E, CDK4-Ciclina D; FLT3; Inhibidor de la Cinasa de NF-κB.
B-08	EGFR y BRAF; Complejos CDK2-Ciclina A, CDK3-Ciclina E, CDK9-Ciclina T1; Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Beta; MAPK 8, 9 y 14; Proteína Tirosín Cinasa ABL1; Proteína Serina/Treonina Cinasa Aurora A y B; Receptor del Factor de Crecimiento Transformante Beta Tipo 1; KIT; Proteína Serina/Treonina Cinasa mTOR; Proteína Tirosín Cinasas JAK 2 y 3; Proteína Cinasa C Alfa; CDK9; FLT3; Proteína Serina/Treonina Cinasa Pim 1 y 2; Proteína Serina/Treonina Cinasa AKT; CDC7; Receptor de Andrógenos; Cinasa de PIP3 110 Subunidad Alfa, Beta, Gamma y Delta.
B-09	MET y BRAF; Cinasa de Adhesión Focal 1; Glucógeno Sintasa Cinasa 3 Alfa y Beta; Proteína Tirosín Cinasas JAK 1, 2 y 3; Proteína Serina/Treonina Cinasa Aurora A; TERT; Sirtuina Desacetilasa 2 Dependiente de NAD; FGFR1; Complejo CDK1-Ciclina B1.

Los resultados de la predicción de dianas concordaron con los resultados que esperábamos obtener. Se ha reportado que la incorporación del farmacóforo de isatina en diversas estructuras ha dirigido la actividad inhibitoria hacia diferentes cinasas, algunas de las cuales se encuentran en los resultados obtenidos. Algunas de estas son el IGFR, EGFR, FLT3, aurora cinasa A y B, Chk1, y GSK3β.¹⁰⁰ Además, se puede observar en los resultados de todos los compuestos evaluados,

la aparición de las CDK como posibles dianas moleculares. Esto concuerda con lo reportado por Bramson y Davis, que sintetizaron moléculas estructuralmente similares a nuestras propuestas.^{88,89}

Esta dirección de actividad de las moléculas a las cinasas se puede justificar desde el punto de vista estructural. De acuerdo con la literatura, las plataformas de origen indólico como el indol, isatina, indol-3-carbinol, 2-oxoindol, entre otras, presentan afinidad por las cinasas debido a la similitud estructural que presentan con respecto a la adenina del ATP. Es por esta razón que la incorporación del farmacóforo de isatina en el sunitinib y sorafenib (inhibidores de tirosín cinasas aprobados por la FDA) les confiere la capacidad de actuar como inhibidores competitivos por el sitio de unión a nucleótido de las cinasas.^{101–103}

Con base en estos resultados y en la información recabada de los antecedentes, se eligieron las cinasas de las que se tuvo más evidencia para justificar la interacción de la proteína con nuestras moléculas propuestas. Las proteínas seleccionadas fueron las siguientes: EGFR, IGFR, CDK2, CDK2/Ciclina E, CDK1, JAK3, GSK3 β , HER2, Pim1, y BRAF. Esta lista de proteínas se sometió al acoplamiento molecular. Los resultados y su discusión de esa etapa se abordarán en la siguiente sección.

5.1.3 Acoplamiento molecular de los híbridos de isatina

Se llevó a cabo el acoplamiento molecular entre las moléculas propuestas y la lista de posibles proteínas diana que arrojó el ensayo de predicción de dianas. Las energías de afinidad (kcal/mol) y las constantes de disociación (en μM o nM)

calculadas para la interacción más estable de cada compuesto se muestran en las tablas 9 y 10, respectivamente.

Tabla 10. Energías de afinidad (kcal/mol) predichas por el acoplamiento molecular entre los híbridos de isatina y proteínas selectas utilizando AutoDock 4.

Proteínas	B-01	B-02	B-03	B-04	B-05	B-06	B-07	B-08	B-09
CDK2	-5.66	-6.2	-6.49	-5.88	-9	-9.54	-9.74	-9.24	-9.39
CDK/C.E.	-5.43	-5.92	-5.81	-5.59	-7.73	-8.39	-7.62	-8.15	-8.07
CDK1	-5.37	-5.54	-6.27	-6.04	-7.94	-8.41	-8.49	-8.38	-8.07
EGFR	-4.79	-5.08	-5.29	-5.26	-7.47	-7.5	-7.74	-7.5	-6.76
IGFR	-5.19	-5.69	-6.33	-5.27	-7.67	-7.84	-8.04	-7.95	-7.8
GSK3 β	-5.84	-6.57	-7.15	-5.83	-8.29	-8.96	-9.44	-8.28	-8.59
Pim1	-5.82	-6.31	-6.33	-5.85	-8.33	-8.33	-8.87	-8.44	-8.15
BRAF	-5.55	-5.53	-6.01	-5.23	-8.3	-8.46	-8.79	-8.69	-8.21
HER2	-6.01	-5.64	-6.34	-5.84	-8.18	-8.41	-9.14	-8.59	-7.74
JAK3	-5.57	-6.15	-6.12	-5.72	-8.68	-8.67	-9.29	-8.36	-8.4

Tabla 11. Constantes de disociación predichas (μM o nM) por el acoplamiento molecular entre los híbridos de isatina y proteínas selectas utilizando AutoDock 4.

Proteínas	B-01	B-02	B-03	B-04	B-05	B-06	B-07	B-08	B-09
CDK2	70.91 μM	28.77 μM	17.49 μM	48.76 μM	253.94 nM	101.37 nM	73.06 nM	167.77 nM	131.26 nM
CDK/C.E.	105.34 μM	45.95 μM	54.78 μM	79.7 μM	2.15 μM	712.67 nM	2.61 μM	1.05 μM	1.22 μM
CDK1	116.3 μM	86.59 μM	25.18 μM	37.14 μM	1.51 μM	680.76 nM	594.08 nM	722.29 nM	1.22 μM
EGFR	308.3 μM	188.47 μM	131.71 μM	140.45 μM	3.35 μM	3.19 μM	2.11 μM	3.2 μM	11.15 μM
IGFR	156.46 μM	67.95 μM	22.9 μM	137.82 μM	2.39 μM	1.79 μM	1.28 μM	1.48 μM	1.91 μM
GSK3 β	52.4 μM	15.25 μM	5.76 μM	53.66 μM	833.13 nM	272.44 nM	120.42 nM	858.99 nM	507.54 nM
Pim1	54.23 μM	23.63 μM	22.8 μM	51.53 μM	780.99 nM	782.02 nM	314.66 nM	647.83 nM	1.06 μM
BRAF	85.25 μM	87.69 μM	39.18 μM	146.89 μM	828.49 nM	624.87 nM	361.78 nM	427.78 nM	954.52 nM
HER2	39.15 μM	74.03 μM	22.7 μM	52.74 μM	1.01 μM	686.92 nM	200.07 nM	503.14 nM	2.14 μM
JAK3	82.77 μM	31.28 μM	32.78 μM	63.9 μM	437.37 nM	438.27 nM	153.93 nM	750.6 nM	700.93 nM

Se pueden observar energías de afinidad buenas para los híbridos de isatina B-05 al B-09 en la proteína CDK2. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Bramson y Davis, que sintetizaron moléculas estructuralmente similares a nuestras

propuestas, incorporando el farmacóforo de isatina, de bencenosulfonamida y el ligante de hidrazina. Como se mencionó en los antecedentes, la actividad de estas moléculas estuvo orientada a la inhibición de CDK2 y CDK1.^{88,89}

Otra serie de interacciones a destacar es la de los híbridos de isatina B-05 al B-09 con la proteína GSK3 β . Se pudieron observar energías de afinidad buenas y moderadas. Esta interacción está respaldada por el análisis estructura-actividad reportado por *Prakash et al.*, donde se menciona que la incorporación de una hidrazona y una imina en el carbono 3 de la isatina dirige la actividad a la inhibición de las proteínas CDK y GSK3 β .¹⁰⁰

En la tabla de las energías de afinidad se puede apreciar que los híbridos de isatina B-05 al B-09 superan a los compuestos B-01 al B-04 en todas las proteínas que se probaron. Esta observación se puede justificar al abordarla desde el punto de vista estructural. Al ser estructuras más simples las moléculas B-01 al B-04, su promiscuidad aumenta a la par que disminuye su afinidad y selectividad por un cierto grupo de proteínas debido a que estas pueden acomodarse más fácilmente en los sitios de unión. Se ha reportado que las moléculas más simples son aquellas que presentan más promiscuidad. Por el contrario, conforme aumenta el tamaño y la complejidad en la estructura de una molécula como en las moléculas B-05 al B-09, su promiscuidad disminuye y su selectividad por uno o un grupo de blancos proteicos aumenta. Las moléculas más complejas presentan un mayor impedimento entrópico.⁵⁶

En el caso de la tabla 10, volvamos a centrarnos en las moléculas que presentaron las mejores energías de afinidad, es decir, los compuestos B-05 al B-09. Para la

proteína CDK2, estas moléculas presentaron valores que iban desde 73.06 nM hasta 253.94 nM. Es interesante notar que estas estimaciones coincidieron con algunos de los valores experimentales reportados por Bramson y Davis para los derivados 5BR y 45SN, respectivamente. Para el compuesto 5BR, los valores experimentales de IC_{50} para la CDK2 y CDK1 fueron de 60 nM y 780 nM, respectivamente. Para el compuesto 45SN, sus resultados de IC_{50} para la CDK2 y CDK1 fueron de 10 nM y 110 nM. De esta manera, integrando todos los resultados obtenidos en la predicción de dianas y el acoplamiento molecular pudimos respaldar el diseño de las moléculas propuestas B-05 al B-09. A pesar de que las moléculas B-01 al B-04 no mostraron constantes de disociación en el orden nanomolar se decidió continuar con ellas en las siguientes etapas. Esto se justificó bajo la siguiente premisa: al ser moléculas más simples y pequeñas, su selectividad hacia una diana iba ser menor en comparación con las del B-05 al B-09, pero su promiscuidad iba a ser mayor. Las constantes de acoplamiento de todas estas moléculas en el orden de micromolar, y ninguna de estas alcanzando la escala nanomolar, refuerzan la premisa anterior.

5.1.4 Modelado molecular de los híbridos de isatina

Con el objetivo de analizar las interacciones que montaban los híbridos de isatina con la lista de proteínas utilizadas en el acoplamiento molecular. Los archivos con la mejor interacción de cada híbrido de isatina se sometieron a un modelado molecular en LigPlot+ y UCSF Chimera. A continuación, se mostrarán los resultados

y discusión del modelado molecular de B-01, B-05 y B-09, las plataformas estructuralmente con más diferencias entre ellas.

a) Modelado molecular de B-01

En la figura 26 se puede observar la interacción en 3D y 2D del ligando B-01 con la proteína diana HER2. La energía de afinidad para esta interacción fue -6.01 kcal/mol. En la imagen se pudo apreciar la formación de tres puentes de hidrógeno, estos se establecieron entre: el grupo amino con Ser783, el carbonilo de con Leu785, y el nitrógeno de la amida con Met774. Cabe mencionar que las interacciones tenían la distancia óptima para la formación de puentes de hidrógeno, siendo este rango de distancia de aproximadamente 2.4-2.7 Å. Además, se observaron interacciones de Van der Waals entre los residuos de aminoácido Val773, Ala775, Tyr784, Tyr835, Val839, y Phe864 de HER2 con el esqueleto cíclico de B-01.¹⁰⁴

Hay que mencionar que dentro de la literatura no se encuentran antecedentes de la interacción entre híbridos o derivados de isatina y la proteína HER2. Aunque en nuestro acoplamiento molecular, fue la proteína que presentó mejor interacción con B-01.

inhibidor competitivo.¹⁰⁵ Además, estas interacciones se han reportado por Bramson para el híbrido de isatina análogo 5BR cristalizado en la CDK2. Bramson reportó la formación de tres puentes de hidrógeno: dos entre el grupo sulfonamida y Asp86, y una entre el carbonilo y Leu87. El híbrido 5BR también estableció una interacción π entre los anillos aromáticos de la porción de isatina y de Phe85; y fuerzas de Van der Waals entre el anillo aromático de la porción de bencenosulfonamida e Ile10.

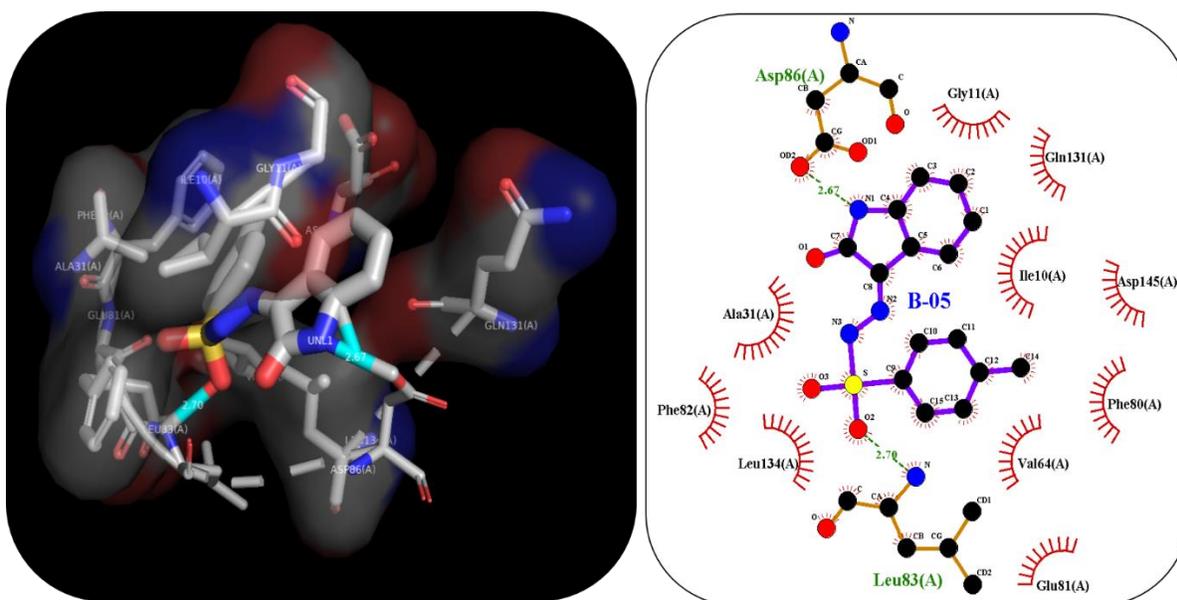


Figura 27. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-05 con la proteína cinasa CDK2.

c) Modelado molecular de B-09

En la figura 28 se puede observar la interacción en 3D y 2D del ligando B-09 con la proteína CDK2. La energía de afinidad para esta interacción fue -9.39 kcal/mol. En la imagen se pudo apreciar la formación de tres puentes de hidrógeno (todos con la distancia óptima): uno entre nitrógeno de la amida y Glu81, uno entre el carbonilo de la amida y Leu83, y el último entre el nitrógeno de la amida de la otra porción de

isatina e Ile10. Se observó la formación de interacciones de Van der Waals entre los anillos de B-09 y los siguientes residuos de aminoácido: His84, Phe82, Gln85, Asp86, Gly11, Val18, Ala31, Val64, Phe80, Leu134, Ala144, y Asp145. De la misma manera que con B-05, algunas interacciones de B-09 se establecieron con residuos de aminoácido reportados para el sitio de unión a ATP de la CDK2. Algunos de los residuos más importantes de este sitio son: 10-18, 33, 81-83, 86, y 129-132, estos corresponden a los residuos directamente implicados en la unión del ATP; 132 y 145 corresponden a los residuos implicados en la unión con el magnesio; y 127 corresponde a un residuo implicado en el sitio activo.¹⁰⁵

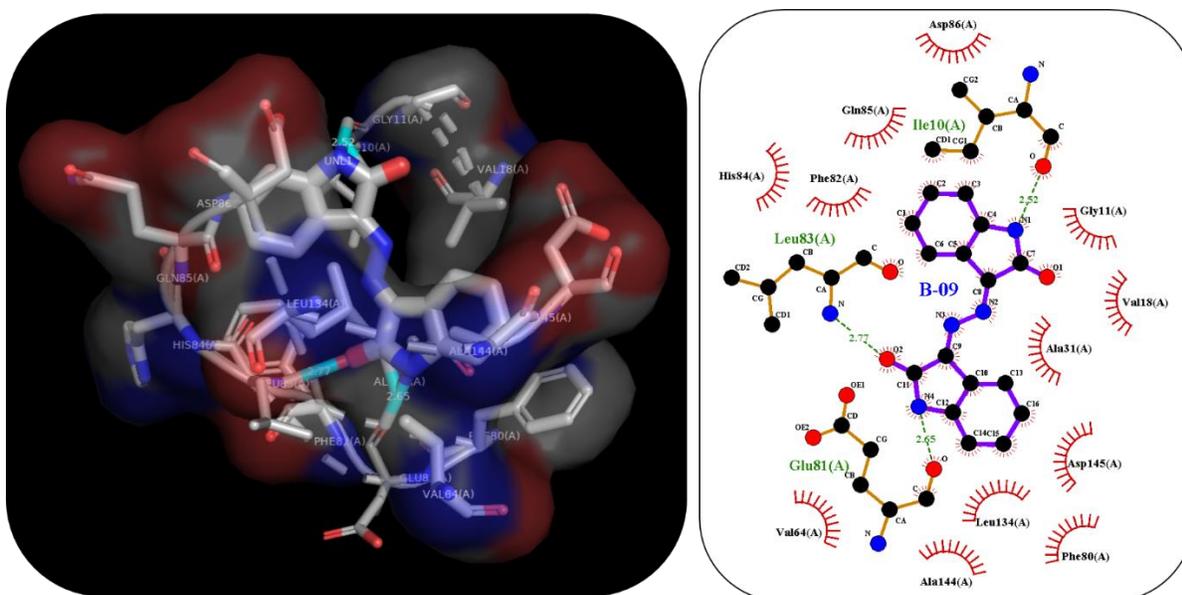


Figura 28. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-09 con la proteína cinasa CDK2.

Con base en los resultados del acoplamiento molecular, el modelado molecular y los antecedentes experimentales de moléculas análogas se puede sustentar el diseño de nuestras moléculas híbridas. Además, teniendo en cuenta los resultados

del modelado, pudimos confirmar lo reportado por Hu *et al.* Las moléculas más simples son las que presentan mayor promiscuidad debido a que no establecen el número de interacciones necesarias para estabilizar su estructura dentro del sitio activo de una proteína o grupo de proteínas.⁵⁶

5.1.5 Estimación de las propiedades farmacocinéticas

Con el objetivo de reducir el número de moléculas a sintetizar y evaluar se decidió tomar en cuenta a los factores farmacocinéticos de las moléculas propuestas. Para evaluar estos parámetros, todos los híbridos se sometieron a una predicción de propiedades farmacocinéticas en la herramienta SwissADME del SIB. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 11.¹⁰⁶

Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos estimados de los híbridos de isatina.

Compuesto	Peso molecular (Da)	# de donadores de H	# de aceptores de H	iLog P	Accesibilidad sintética	Reglas de Lipinski
B-01	161.16	2	2	0.88	1.86	Si
B-02	195.61	2	2	1.1	1.93	Si
B-03	203.24	2	2	1.62	2.21	Si
B-04	191.19	2	3	1.26	2.06	Si
B-05	315.35	2	4	1.53	2.76	Si
B-06	349.79	2	4	2.16	2.77	Si
B-07	357.43	2	4	2.41	3.09	Si
B-08	345.37	2	5	1.6	2.9	Si
B-09	290.28	2	4	1.44	2.54	Si

Se decidió trabajar utilizando solo los parámetros necesarios para determinar si los compuestos cumplen las reglas de Lipinski. Estas reglas se utilizan en la química

medicinal con el objetivo de estimar el carácter “druglikeness”, es decir, las características deseadas relacionadas a la biodisponibilidad de una molécula. De acuerdo con la literatura, para que un compuesto siga las reglas de Lipinski este deberá cumplir cuatro características: 1) tener un peso molecular menor a 500 Da, 2) tener un número de donadores de puente de hidrógeno menor que cinco, 3) tener un número de aceptores de puente de hidrógeno menor que diez, y 4) tener un coeficiente de reparto octanol-agua ($\log P$) menor de 5. Los resultados muestran que todos los híbridos que se propusieron cumplen las reglas de Lipinski, al menos utilizando parámetros calculados que, de acuerdo con la literatura, tienen una buena aproximación.

Posteriormente, los híbridos de isatina diseñados se sometieron a una evaluación general en el diagrama de huevo hervido en la misma plataforma con el objetivo de identificar los posibles mejores candidatos en cuanto a absorción intestinal (HIA, por sus siglas en inglés), absorción a través de la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés), y aquellos que sean posibles sustratos de la glucoproteína P (PGP, por sus siglas en inglés). Los resultados del diagrama de huevo hervido se muestran a continuación en la figura 29.¹⁰⁷

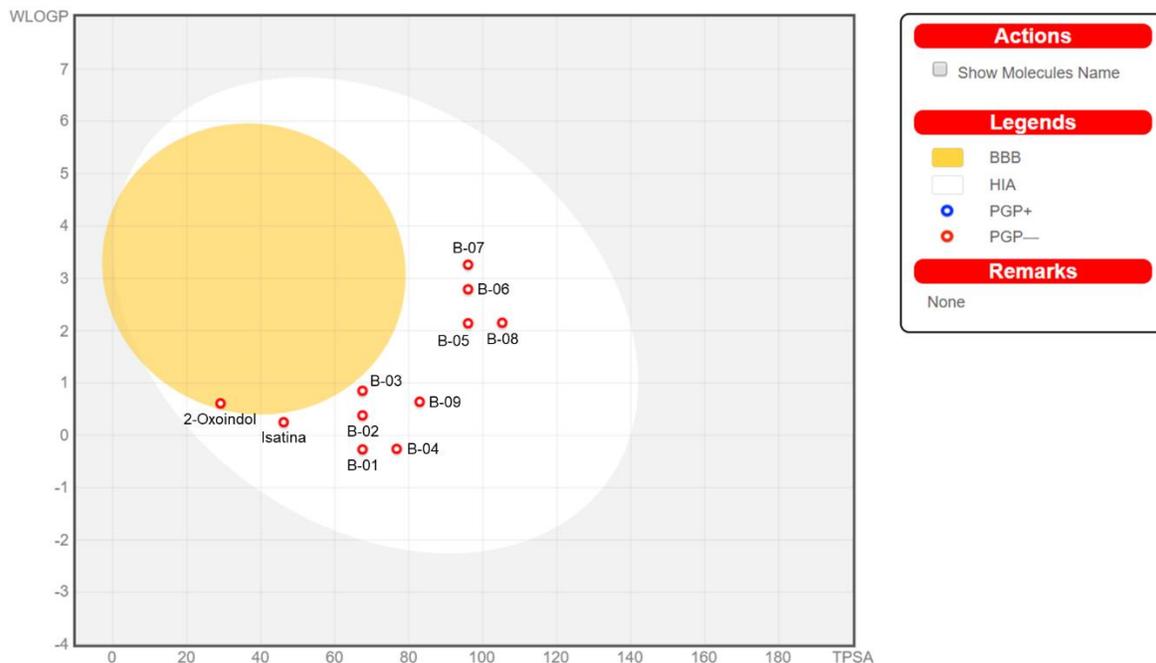


Figura 29. Diagrama de huevo hervido de los híbridos de isatina. Abreviaturas: barrera hematoencefálica (BBB), absorción intestinal humana (HIA), glucoproteína P positivo (PGP+), glucoproteína P negativo (PGP-).

El diagrama de huevo hervido predijo que, posiblemente, todos los híbridos de isatina serán absorbidos a nivel intestinal y ninguno será capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual es algo que se desea en farmacocinética. Además, podemos observar que todos los compuestos diseñados no son posibles sustratos de la glucoproteína P, lo que significa que estos no podrán ser expulsados fuera de las células en tumores que presenten el fenómeno de resistencia farmacológica. Además, esto concuerda con lo reportado por Kassan *et al.* que sintetizó al compuesto HBIa (véanse los antecedentes) incorporando la porción de isatina y este mostro actividad anticancerígena en las líneas celulares KB-3-1, y su versión multifármaco resistente que expresa la glucoproteína P, KB-V1. Esto es

interesante ya que se ha reportado que las sustancias de origen indólico, como las del presente proyecto, han sido capaces de inhibir bombas de expulsión de fármacos.⁹⁰

Finalmente, para reducir el número de moléculas se tomaron en cuenta los resultados del diagrama de huevo hervido, los parámetros farmacocinéticos de las reglas de Lipinski y un tercer criterio, la accesibilidad sintética. Este último criterio representa la dificultad para obtener un compuesto de interés mediante métodos de síntesis química. Entre mayor sea el coeficiente de accesibilidad sintética este será más difícil de obtener. Los coeficientes de accesibilidad sintética de los híbridos diseñados se muestran en la tabla pasada.

Tomando todos estos criterios en conjunto se decidió descartar a los híbridos B-03 y B-07 de la síntesis química por representar a las moléculas con mayores coeficientes de accesibilidad sintética, y debido a que el resto presentaba mejores parámetros farmacocinéticos. Esto lo podemos observar incluso en el diagrama de huevo hervido, siendo los derivados B-03 y B-07 los más elevados en el eje del WLogP de sus respectivas plataformas.

5.2 Resultados y discusión de la síntesis química

5.2.1 Síntesis química

La síntesis de los híbridos de isatina se llevó a cabo mediante la reacción de formación de iminas con el procedimiento general descrito en la sección de metodología. La reacción de formación de iminas inició con la disolución de 1 equivalente isatina en MeOH, y la adición de 2.5 equivalentes de hidrazina mohidratada (o p-toluensulfonilhidrazida, según sea el caso) a esta disolución. De acuerdo con diferentes pruebas realizadas, la relación de equivalentes 1:2.5 fue la mejor en cuanto a los rendimientos de reacción obtenidos cercanos al 90% en las pruebas iniciales. Además, los tiempos de reacción con esta proporción fueron bajos, siendo estos de entre 30 y 60 minutos. Se intentó una relación de equivalentes 1:13, es decir, añadir en exceso la hidrazina o hidrazida para favorecer una conversión completa al desplazar el equilibrio de reacción hacia los productos, sin embargo, los rendimientos obtenidos cercanos al 80% seguían siendo inferiores a la relación previa. Además, utilizar un exceso de hidrazina o hidrazida para la relación 1:13 implicaba un gasto constante de materia prima que no se recuperaba en el proceso de purificación, sin embargo, los tiempos de reacción si llegaban a disminuir, llegando a alcanzar hasta los 30 minutos. De la misma manera, se intentó la reacción empleando una relación de equivalentes más baja de 1:1.3. Sin embargo, esto supuso una disminución en el rendimiento de reacción y un mayor tiempo de esta (3-4 horas).

Durante el transcurso de la reacción se observaron cambios apreciables en el color de la mezcla de reacción, siendo una solución color naranja al inició y, posteriormente, cambiando progresivamente a una suspensión de color amarillo verdosa, y finalmente amarillo (a excepción del compuesto B-09 cuya mezcla de reacción era de color rojo al final). Estos cambios en el color de la mezcla de reacción se debían a la alteración del sistema de doble enlace de la alfa-cetoamida característico de la isatina. Luego de la adición de la porción de hidrazina o p-toluensulfonilhidrazida, el grupo ceto conjugado con el anillo aromático de seis miembros de dicho sistema se transforma en un grupo imino que además está unido a un grupo amino o p-toluensulfonilamino, respectivamente. Esta sustitución disminuye el efecto batocrómico que el carbonilo del grupo ceto generaba en la isatina. Por este motivo, la longitud de onda de la radiación visible absorbida por el producto de la reacción disminuye, conduciendo a la generación de un color amarillo (véase la figura 30).

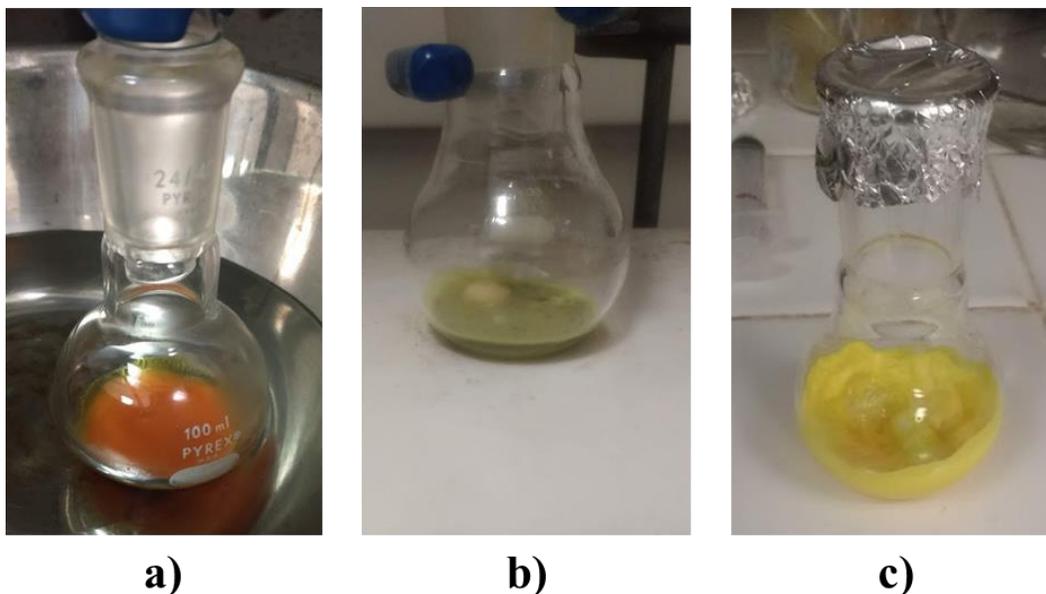


Figura 30. Apariencia macroscópica del transcurso de la reacción de formación de iminas para la síntesis del compuesto B-01. a) Al inicio de la reacción, la solución se observó de un color naranja. b) A los 10 minutos de reacción, la mezcla se observó de un color verde-amarillento. c) Al final de la reacción, se observó un sólido amarillo.

Caso contrario con el compuesto B-09, la longitud de onda de la radiación visible absorbida aumentó generando un color rojo. Esto debido a que insertar una porción de isatinilhidrazona ocasionaba un efecto batocrómico por extensión de la conjugación (véase la figura 31).



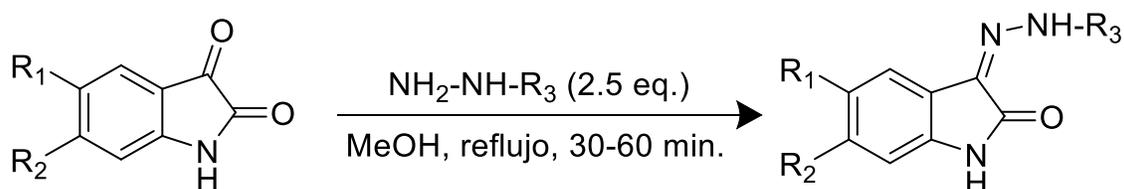
Figura 31. Apariencia macroscópica del final de la reacción de formación de iminas para la síntesis del compuesto B-09. Se pudo observar la formación de un sólido rojizo insoluble en metanol.

Como se mencionó en breve, durante el transcurso de la reacción, además del cambio de color de esta, se generaba una suspensión. Esto se debía a la precipitación del producto en el MeOH a causa de una baja solubilidad en este (motivo por el cual fue seleccionado como solvente de reacción). Aprovechando esta situación, el tratamiento de muestra y la purificación se pudieron llevar a cabo de una manera más rápida y sencilla. En pruebas de reacción previas el solvente utilizado era agua, sin embargo, retirar el agua de la mezcla de reacción dificultaba el proceso de tratamiento y purificación. Los rendimientos de reacción observados al utilizar agua como solvente fueron de entre el 37% y 50%, en parte por las pérdidas de producto durante las etapas ya mencionadas y, por otro lado, por la reacción de hidrólisis que el agua genera sobre las iminas. Es muy importante recalcar este último factor, ya que debemos recordar que la reacción de formación de iminas es un equilibrio entre la formación y la hidrólisis, donde el agua es un

producto de la primera. Sin embargo, una elevada concentración de agua (como cuando se utiliza como solvente) puede provocar el desplazamiento del equilibrio de reacción hacia reactivos, afectando enormemente el rendimiento de reacción. Por esta razón, el empleo de MeOH o EtOH supone una ventaja sobre el uso de agua como solvente de reacción, aunque se optó por el MeOH, ya que tanto las materias primas como el producto presentan una ligera solubilidad en el EtOH, y el MeOH es más fácil de eliminar de la mezcla de reacción por rotaevaporación.

Una vez finalizó la reacción, se dismanteló el equipo de reflujo, y la mezcla de reacción se llevó a refrigeración por al menos una hora. Esto disminuyó la solubilidad del producto en el MeOH aún más, y aumentó la recuperación del producto en los pasos posteriores.

Con base en todas las observaciones recabadas durante la síntesis química, la ecuación de la reacción se vería de la siguiente manera al incluir las condiciones que mejor funcionaron (véase el esquema 2).



Esquema 2. Reacción de formación de iminas optimizada para la síntesis de los híbridos de isatina. En la estructura de la isatina (izquierda) los radicales pueden ser los siguientes. R₁: -OCH₃ y R₂: -CH(CH₃)₂ o -Cl. En la estructura de la hidrazina (flecha) el radical puede ser R₃: -H o -SO₂(C₆H₄)CH₃.

5.2.2 Purificación de la reacción

La purificación de las reacciones inició a partir de la suspensión del producto en MeOH en frío. Esta suspensión se filtró a vacío y el sólido retenido en el papel filtro se lavó con más MeOH frío. El papel filtro con el sólido limpio se colocó en una estufa de secado a una temperatura de 65 °C, con el objetivo de evaporar el MeOH y secar el sólido.

Posteriormente, siguiendo el procedimiento descrito en la parte de metodología, el sólido se recristalizó utilizando EtOH como solvente seleccionado. Esta selección se basó en pruebas de solubilidad a temperatura ambiente y temperaturas cercanas a la ebullición utilizando diferentes solventes. Dentro de estas pruebas se evaluaron metanol, etanol, hexano, acetato de etilo, tolueno, éter etílico, acetona y agua. Solo el etanol cumplió con la característica de no disolver los productos a temperatura ambiente, y disolverlos a temperaturas cercanas a la ebullición. En la figura 32 se muestran una imagen del producto B-01 recristalizado y seco, y las pruebas de solubilidad realizadas para la recristalización del producto B-09.

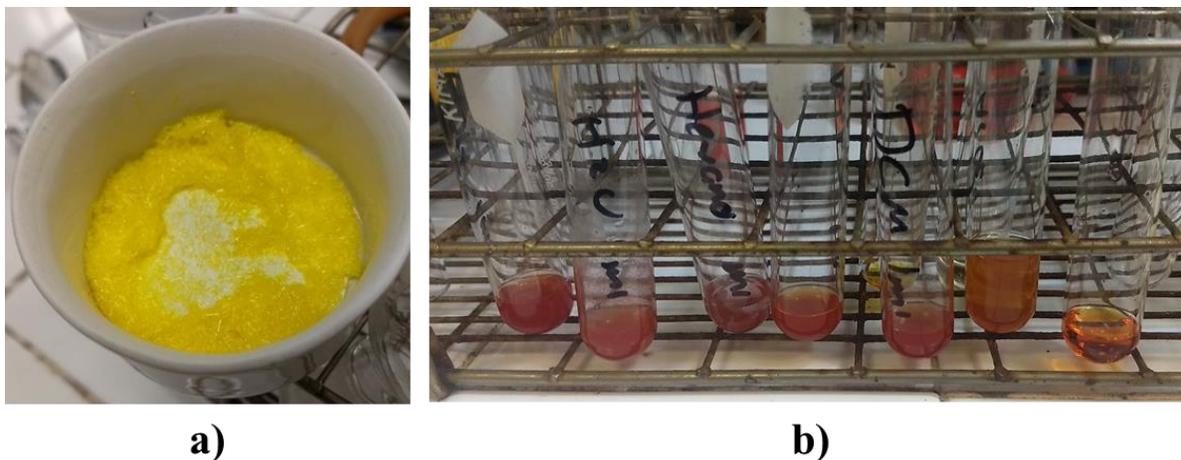


Figura 32. Imágenes del proceso de purificación de los híbridos de isatina. a) Cristales amarillos del producto B-01 al final de la recrystalización. b) Pruebas de solubilidad del producto B-09 en diferentes solventes: éter, agua, hexano, acetato de etilo, diclorometano, acetona, y dimetilsulfóxido (de izquierda a derecha).

5.3.3 Rendimientos de reacción

Se sintetizaron y purificaron seis híbridos de isatina con rendimientos buenos a moderados a través de la reacción de formación de iminas que se planteó en la sección de metodología. Estas seis moléculas fueron aquellas con las claves B-01, B-02, B-05, B-06, B-08 y B-09. En las figuras 33 y 34 se muestra la apariencia física de los compuestos.

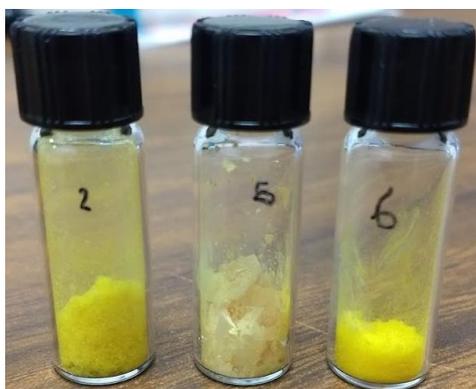


Figura 33. Aspecto macroscópico de los híbridos de isatina B-01, B-02 y B-06 (de izquierda a derecha) obtenidos por recristalización. Los compuestos B-01 y B-06 se pueden apreciar como agujas finas de color amarillo. El compuesto B-02 se observa como placas color amarillo pálido.

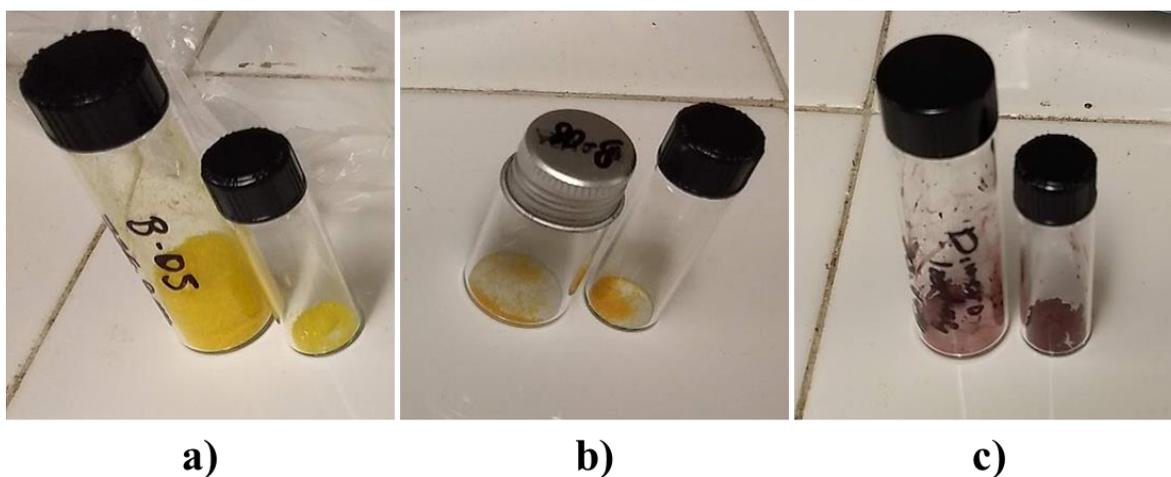
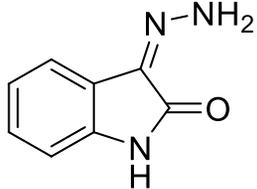
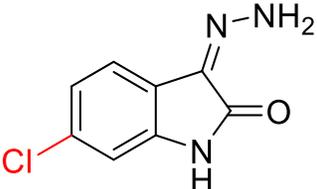
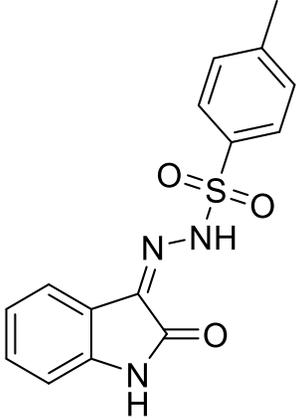
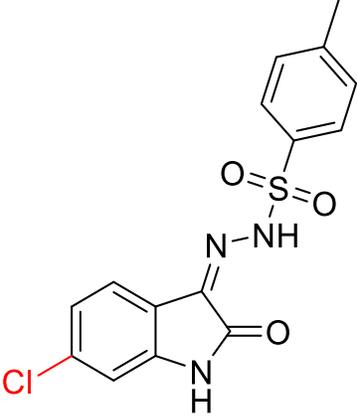
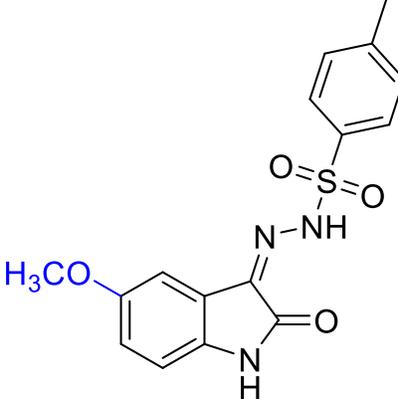
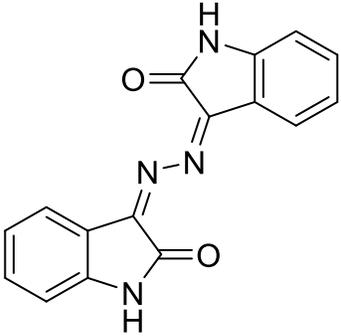


Figura 34. Aspecto macroscópico de los híbridos de isatina obtenidos por recristalización. a) B-05 se aprecia como agujas finas color amarillo. b) B-08 se aprecia como cristales amarillos de tono oscuro. c) B-09 se aprecia como un sólido amorfo color guindo.

A continuación, se muestra la tabla 12 con los rendimientos de reacción obtenidos en la síntesis de los híbridos de isatina mencionados.

Tabla 13. Rendimientos de reacción de la síntesis de los híbridos de isatina.

Clave	Estructura química de los productos	Rendimiento de reacción (%)
B-01	 <p>The structure shows a benzene ring fused to a five-membered indole-1,2-dione ring. The nitrogen at position 1 has a hydrogen atom. The carbonyl group at position 2 is double-bonded to a nitrogen atom, which is further bonded to a hydrazide group (-NH₂).</p>	95%
B-02	 <p>The structure is identical to B-01, but with a chlorine atom (Cl) attached to the benzene ring at the 5-position.</p>	48%
B-05	 <p>The structure shows the isatin core with a hydrazide group at position 2. The nitrogen of the hydrazide group is bonded to a sulfonamide group (-SO₂-NH₂), which is further bonded to a 4-methylphenyl ring.</p>	68%

B-06		72%
B-08		4%
B-09		95%

Se intentó llevar a cabo la síntesis de los compuestos B-03, B-04, y B-07, sin embargo, la reacción generaba muchos subproductos y, por ende, la cantidad de producto de interés que se intentó purificar era mínima. Además, se observó la aparición de la isatina sustituida correspondiente en las placas de TLC durante el

proceso de purificación de cada producto. Esto nos dio indicios de que los productos posiblemente se estaban hidrolizando. Finalmente, se decidió abandonar la síntesis de las moléculas B-03, B-04, y B-07. Esto debido a que los ensayos biológicos podrían no ser concluyentes ya que, aunque se llegara a la síntesis y purificación de los productos, estos se podrían hidrolizar en el medio o durante el almacenamiento de las soluciones stock y regenerar las materias primas. Por este motivo, en realidad no se estarían evaluando dichas moléculas, si no sus materias primas.

5.3.4 Relación del mecanismo de reacción de la formación de iminas con los rendimientos obtenidos

Analizando el mecanismo de reacción de la formación de iminas se pueden explicar parcialmente las variaciones en los rendimientos obtenidos de las moléculas con grupos activadores o desactivadores.

Se inició el análisis partiendo de la reactividad que aporta cada grupo activador o desactivador del anillo aromático al carbono del grupo ceto. El radical cloro de la 6-cloroisatina que está en posición para con respecto al carbonilo tiene la capacidad de estabilizar cargas positivas en el anillo donando un par de electrones y generando un ion cloronio, sin embargo, debido a la diferencia de tamaños atómicos el solapamiento entre los orbitales del cloro y carbono no es tan óptima. La presencia del radical cloro lleva a la molécula de 6-cloroisatina a poseer 4 estructuras resonantes. En la 5-metoxiisatina, el radical metoxilo no tiene la

capacidad de estabilizar cargas positivas en el anillo debido a su posición en meta con respecto al carbonilo. Esto conduce a que la 5-metoxiisatina solo tenga 3 estructuras resonantes. Por último, en la 6-isopropilisatina, el radical isopropilo tiene la capacidad de estabilizar cargas positivas en el anillo debido a través de su efecto inductivo, y debido a que ambos átomos son carbonos el solapamiento de orbitales se da de mejor manera. En conclusión, pudimos identificar el siguiente orden de reactividad para las isatinas sustituidas: isatina>5-metoxiisatina>6-cloroisatina>6-isopropilisatina. Llegamos a la conclusión de que la isatina podría ser la más reactiva ya que no aporta el efecto estabilizador de cargas de cargas positivas en el anillo. De la misma manera, la 5-metoxiisatina sería la siguiente más reactiva al no contribuir a la estabilización de cargas positivas. Al donar electrones por resonancia al anillo, aunque no de manera óptima por el solapamiento de orbitales, la 6-cloroisatina sería la siguiente más reactiva. Finalmente, la 6-isopropilisatina sería la menos reactiva debido a su capacidad de estabilización de la carga positiva a causa del efecto inductivo que puede ejercer el radical 6-isopropilo sobre el anillo. El grupo carbonilo de la cetona va a ser el sitio atacado por el grupo amino de la hidrazina, este ataque se da a causa de la polarización parcial positiva que se da en el carbono a causa de la electronegatividad del oxígeno. Sin embargo, esta carga positiva puede disminuir y ser estabilizada o no por el anillo aromático adyacente al carbonilo, todo dependerá de los sustituyentes del anillo. Cualquier factor estructural o electrónico que contribuya a la estabilización de la carga positiva del grupo carbonilo hará a la materia prima menos reactiva.

Bajo este marco teórico podemos entender porque la isatina y la 6-cloroisatina generaron buenos rendimientos, sin embargo, no se explica el bajo rendimiento al emplear a la 5-metoxiisatina como materia prima.

De acuerdo con los resultados de síntesis de Bramson *et al.*, los peores rendimientos se obtuvieron cuando los grupos activadores como el hidroxilo, se encontraban en la posición 5 del anillo aromático de isatina, la misma posición que el grupo metoxilo de nuestra materia prima. Por otro lado, cuando los grupos activadores como el fenóxido, se encontraban en la posición 6 se obtenían buenos rendimientos (cerca al 90%). Esto debido a que, en esta posición, el oxígeno puede donar electrones al anillo en las posiciones necesarias para estabilizar la carga positiva generando una forma contribuyente de resonancia extra y, por ende, aumentando la reactividad del grupo carbonilo.⁸⁸

Es posible que el grupo metoxilo en la posición 5 del anillo introduzca densidad electrónica al anillo en todos los carbonos y no solo a posiciones específicas lo que, a final de cuentas, contribuiría a la estabilización de la carga positiva y a la consiguiente disminución en los rendimientos. De acuerdo con los resultados de Bramson *et al.*, el producto nitrado en la posición 5 se obtuvo con un buen rendimiento (96%). Al igual que el grupo metoxilo, el grupo nitro en esa posición no contribuye a la estabilización de la carga positiva. Sin embargo, a diferencia del grupo metoxilo, el grupo nitro, a través de su efecto electroatractor, podría disminuir la densidad electrónica en el anillo en todos los carbonos y ocasionar un aumento en la reactividad del carbonilo del grupo ceto.

Para nuestra sorpresa, los rendimientos reportados por Bramson *et al.* para los productos alquilados en la posición 6 fueron buenos (alrededor del 70%), comparados con los rendimientos por debajo del 1% que se obtuvieron en el proyecto. Esto indicaría que los grupos alquilo pueden contribuir a la reactividad de la molécula a través de otros efectos diferentes a los electrónicos, puesto que de acuerdo con la teoría de los grupos electroattractores y electrodonadores, estos se deberían de comportar como los hemos descrito. A su vez, estos resultados nos indican que el problema en la reacción de formación de iminas de la 6-isopropilisatina pudo deberse en mayor medida a las condiciones de reacción. A diferencia de las condiciones que se utilizaron en el presente proyecto, Bramson *et al.* reportó el uso de una relación 1:1 en sus materias primas, utilización de EtOH como solvente de reacción (en una relación de 9 mL de EtOH por cada 100 mg de isatina), una reacción en condiciones de reflujo por dos horas, y la filtración de la mezcla de reacción caliente (con un paso de secado con aire) como método de purificación.⁸⁸

5.3 Resultados y discusión de la caracterización estructural

Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono de cada uno de los híbridos de isatina que se sintetizaron utilizando un equipo de 400 MHz y 150 MHz, respectivamente. A cada uno de los espectros se le determinaron los parámetros de multiplicidad, integración, constantes de acoplamiento y desplazamiento químico de las señales. A continuación, solo se

mostrarán y discutirán los resultados concernientes a los híbridos de isatina B-01, B-05 y B-09, ya que estructuralmente, B-01 y B-05 son las plataformas base de los demás derivados, por lo que las señales en los espectros de los compuestos restantes solo son variaciones de estas dos. Por otro lado, en el caso de B-09, se seleccionó para mostrar y discutir sus resultados debido a que es la única molécula híbrida en su tipo. Los resultados y la discusión iniciaran con la plataforma B-01, continuaran con B-05 y finalizaran con B-09.

5.3.1 Elucidación estructural de B-01

Iniciando con el espectro de resonancia magnética nuclear de protón del compuesto B-01, pudimos observar siete señales y una integración de un protón en cada una de estas, coincidiendo con el número de protones esperado para la molécula. A continuación, se describirán las señales observadas en el espectro, su desplazamiento químico, multiplicidad, constantes de acoplamiento, y el protón asignado según la estructura química. Posteriormente, se discutirán los motivos de esta asignación con mayor detalle.

La primera señal estuvo presente en 6.86 ppm en forma de doblete y correspondió al protón Ha del carbono aromático orto con respecto al nitrógeno de la amida. Su constante de acoplamiento fue de 7.68 Hz. En 6.97 ppm y 7.15 ppm se presentaron dos señales con multiplicidad de triple de doblete y con constantes de acoplamiento de 7.56 Hz y 0.81 Hz, y 7.68 Hz y 1.10 Hz, respectivamente. Estas señales del espectro se asignaron a los protones de los carbonos para (Hb) y meta (Hc) con

respecto al nitrógeno de la amida (y adyacente al carbono orto de la señal previa). Posteriormente, se observó una señal de doblete en 7.36 ppm con una constante de acoplamiento de 7.56 Hz que se asignó al protón Hd del carbono aromático en meta con respecto al nitrógeno de la amida y orto con respecto al grupo imino. Más adelante a campo bajo, se observa otro par de dobletes posicionados en 9.56 ppm (He) y 10.54 ppm (Hf) con constantes de acoplamiento de 14.56 Hz y 14.52 Hz, respectivamente. Estas dos señales se atribuyeron a los dos protones del grupo amino enlazado al nitrógeno del grupo imino. Finalmente, se observó una señal de singulete en 10.69 ppm atribuida al protón Hg enlazado al nitrógeno de la amida. Esta asignación se llevó a cabo empleando las constantes de acoplamiento ya mencionadas, y tomando en cuenta los efectos electrónicos inductivos y de resonancia que los sustituyentes del anillo aromático ejercen sobre los protones presentes en el mismo.

La primera señal se asignó como el protón Ha debido a que el nitrógeno de la amida en posición orto actúa como donador de electrones en el anillo y aumenta la densidad electrónica en las posiciones orto y para. Este aumento en la densidad electrónica genera un efecto de apantallamiento que disminuye el desplazamiento de los protones aromáticos en estas posiciones hacia campo alto (menores desplazamientos). Sin embargo, tanto el protón Ha como el Hb son afectados por el efecto de apantallamiento del nitrógeno, por lo que cualquiera de los dos podría corresponder a la primera señal. No obstante, la multiplicidad de la primera señal era un doblete, por lo que el protón en cuestión solo puede tener un hidrógeno vecino, situación esperada para el protón Ha. Por otro lado, la segunda señal

presente en el espectro con multiplicidad de triple de doblete si correspondió al protón Hb cuyo desplazamiento se esperaba que fuera afectado por el efecto de apantallamiento del nitrógeno, y cuya multiplicidad se esperaba que fuera de un triplete al acoplarse con dos hidrógenos vecinos. Además, este triplete puede dobletearse debido a la presencia de un acoplamiento en meta con el protón Ha, esto se confirma porque una constante de acoplamiento fue de 0.81 Hz, un valor muy bajo característico de este tipo de acoplamientos. Para la asignación de la tercera y cuarta señal a los protones Hc y Hd, respectivamente, se siguió una lógica similar. La tercera señal presenta una multiplicidad de triple de doblete que solo podría generarse por el acoplamiento del protón Hc con dos hidrógenos vecinos, y un acoplamiento en meta con el hidrógeno Hd, incluso la constante de acoplamiento de esta última interacción es de un valor bajo (1.10 Hz) como se observaba en el caso pasado. De la misma manera, la cuarta señal presenta una multiplicidad de doblete que solo podría generarse por el acoplamiento del protón Hd con un hidrógeno vecino. En cuanto a los desplazamientos químicos, se pudo observar que los protones Hc y Hd están desplazados a campo bajo (desplazamientos más altos) con respecto a los protones Ha y Hb, esto debido al efecto de desapantallamiento que ejerce el grupo imino sobre las posiciones orto y para con respecto a él. Con estas asignaciones en el anillo aromático, por ende, podemos observar que el protón Ha es vecino al protón Hc, que a su vez esta adyacente al Hb, y este vecino del Hd. Este acomodo se confirma mediante las constantes de acoplamiento donde podemos observar que los protones Ha y Hc tienen el mismo valor, y de la misma manera la constante de acoplamiento de los protones Hb y Hd es igual.

Las señales presentes en 9.56 ppm y 10.54 ppm se asignaron a los protones del grupo amino unido al grupo imino. Esta asignación se hizo con base en los desplazamientos químicos observados, y a su concordancia con la literatura. En el caso de la multiplicidad, se esperaba obtener una señal de singulete con integración para dos protones, asumiendo que estos iban a ser química y magnéticamente idénticos. Sin embargo, posiblemente, debido la densidad electrónica del grupo carbonilo de la amida, estos protones se volvieron químicamente idénticos, pero magnéticamente diferentes. De esta manera, se generaron dos señales de doblete, una correspondiente a cada protón, debido al acoplamiento geminal entre ellos. Esto se confirma con las constantes de acoplamiento obtenidas para cada doblete (14.56 Hz y 14.52 Hz), valores altos característicos para este tipo de interacciones. Finalmente, la última señal en 10.59 ppm se asignó al protón de la amida debido a su desplazamiento a campo bajo tan elevado por el efecto de desapantallamiento que ejerce el anillo aromático (a través de la resonancia) sobre la densidad electrónica del nitrógeno. Además, es la única señal que podría generar una multiplicidad de singulete ya que no tiene la capacidad de acoplarse con otros protones. A continuación, se muestra en la figura 35 el espectro de resonancia magnética nuclear de protón del compuesto B-01.

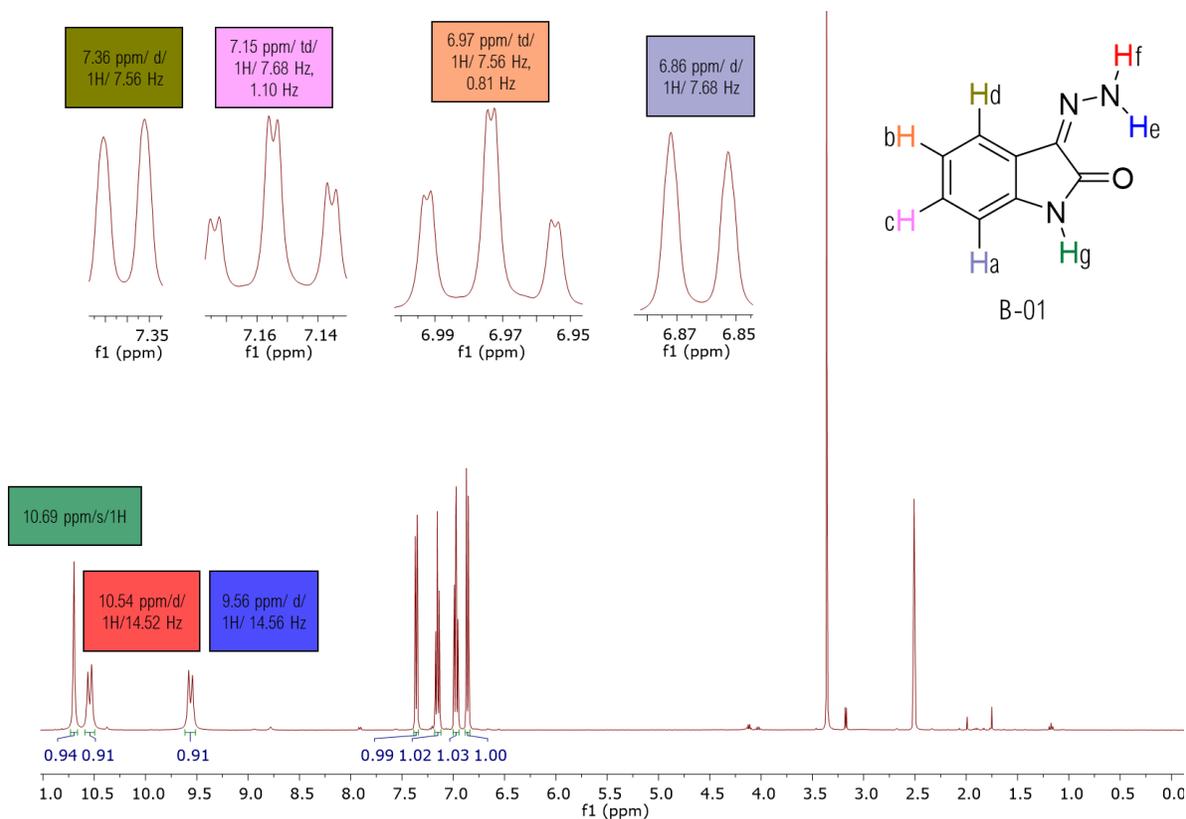


Figura 35. Espectro de RMN-¹H de B-01 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO-d₆ como solvente.

En lo que respecta al espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13, se observaron ocho señales correspondientes a los ocho carbonos presentes en la molécula B-01. A continuación, se describirán las señales observadas en el espectro, su desplazamiento químico y el carbono asignado según la estructura química. Posteriormente, se discutirán los motivos de esta asignación, como en el espectro pasado. Cabe mencionar que en este caso no se mencionará la multiplicidad, la integración y la constante de acoplamiento de cada señal debido a que no se pueden obtener con este tipo de espectro.

La primera señal apareció en 110 ppm y se asignó al carbono C1 posicionado en orto con respecto al nitrógeno de la amida y donde reside el grupo imino; la segunda señal se observó 117 ppm y se asignó al carbono C2 localizado en la otra posición orto con respecto al nitrógeno de la amida; la tercer señal se observó en 121 ppm y se le asignó al carbono C3 posicionado en para con respecto al nitrógeno de la amida; la cuarta y quinta señal aparecieron en 122 ppm y 126 ppm y se asignaron a los carbonos C4 y C5, respectivamente, estos se localizaban en las posiciones meta con respecto al nitrógeno de la amida; la sexta señal se observó en 127 ppm y se asignó al carbono C6 del grupo imino; la séptima señal apareció en 139 ppm y se le asignó al carbono C7 directamente unido al nitrógeno de la amida en el anillo aromático y; la última señal observada en 163 ppm se asignó al carbono C8 del carbonilo del grupo amida. La asignación previa se llevó a cabo tomando en cuenta los efectos electrónicos inductivos y de resonancia del anillo aromático y los sustituyentes presentes en este (véase la figura 36).

La primera señal se asignó al carbono C1 debido a que se espera que tenga el menor desplazamiento a campo alto debido al efecto de apantallamiento que ejerce el nitrógeno del grupo amida sobre las posiciones orto y para. Cabe mencionar que este efecto también se presenta sobre los carbonos asignados C2 y C3, por esta razón son los primeros en aparecer en el espectro. Sin embargo, el carbono C1 se seleccionó como la primera señal debido a que las estructuras resonantes del producto muestran una mayor distribución electrónica sobre C1 a causa de la presencia del grupo imino. La segunda señal se asignó a C2 debido al efecto de apantallamiento del nitrógeno de la amida, y a la carencia de efectos electrónicos

provenientes del grupo imino. De la misma manera, la tercera señal se asignó a C3 que, aunque percibe los mismos efectos ya mencionados para C2, está libre de la influencia de la densidad electrónica del nitrógeno de la amida. Las señales cuarta y quinta fueron asignadas para el carbono C4 y C5, respectivamente, debido a que el grupo imino ejerce un efecto de desapantallamiento sobre las posiciones orto y para, y los desplaza a campo bajo con respecto a las señales previas. La sexta señal se asignó al carbono C6 del grupo imino lo que termino por confirmar la adición de la porción de hidrazina a la molécula de isatina. Se puede observar la desaparición del grupo ceto, que presentaría un desplazamiento a campo bajo de entre 180 ppm y 200 ppm, por un grupo imino que presentó un desplazamiento a campo alto de entre 110 ppm y 140 ppm. Se optó por asignar la séptima señal al carbono C7 debido a que este presenta un efecto de desapantallamiento por el grupo imino, y un efecto inductivo por la mayor electronegatividad del nitrógeno de la amida, generando un desplazamiento altamente desplazado a campo bajo. Finalmente, la última señal presente en 163 ppm se asignó al carbono C8 del carbonilo de la amida. Es importante mencionar que los desplazamientos de carbono para derivados de ácidos carboxílicos como la amida se encuentran entre 160 ppm y 180 ppm, por lo tanto, se confirma la asignación del carbonilo del grupo amida en el carbono C8.

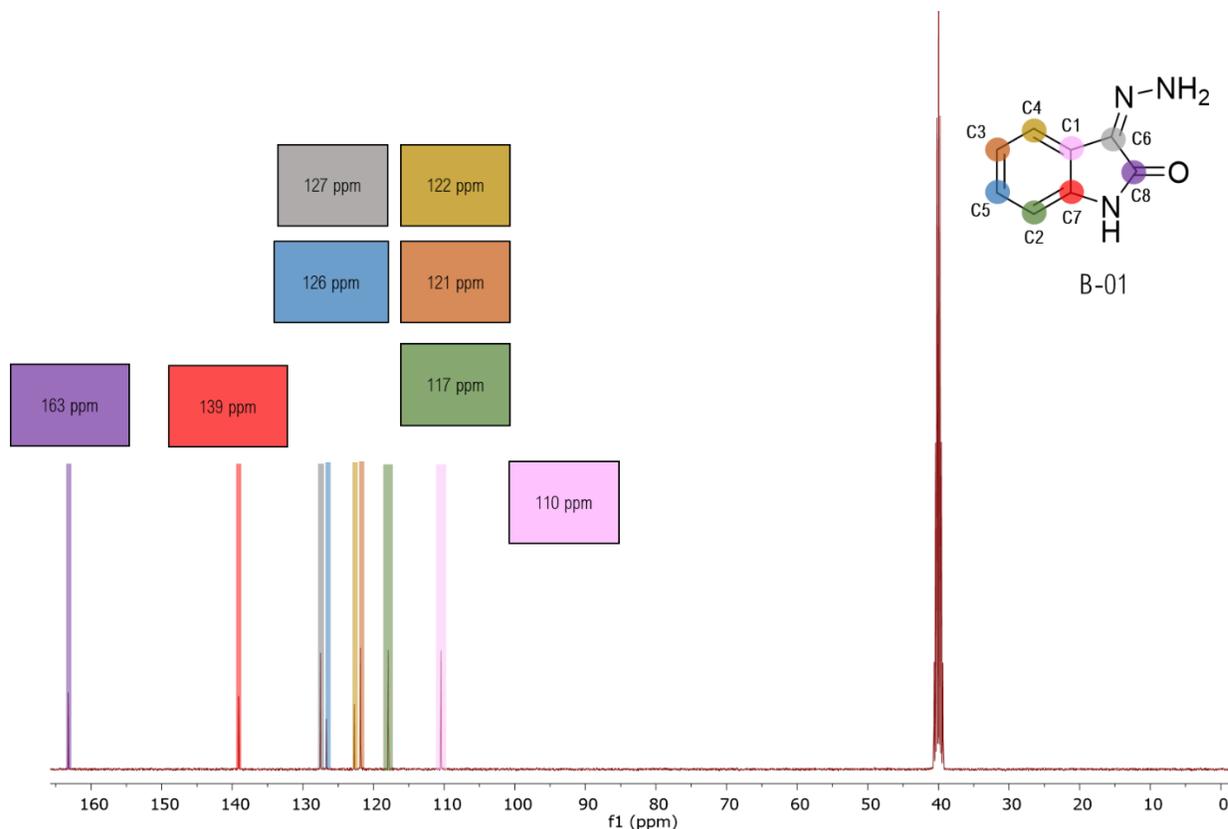


Figura 36. Espectro de RMN- ^{13}C de B-01 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO- d_6 como solvente.

Como se puede observar, tanto las señales del espectro de resonancia magnética nuclear de protón como las del espectro de carbono confirman la estructura química del compuesto B-01. Hay que mencionar que se omitió tomar en cuenta tres señales con elevada intensidad en el proceso de elucidación estructural. Estas señales son: un pentaplete localizado en 2.5 ppm y un singulete en 3.3 ppm en el espectro de RMN- ^1H , y un heptaplete localizado en 40 ppm en el espectro de RMN- ^{13}C . Según la literatura, la señal de 3.3 ppm en el espectro de RMN- ^1H corresponde a los protones presentes en las moléculas de agua residuales en el solvente utilizado

para la técnica debido a la absorción de humedad. Por otro lado, los protones que originan las señales en 2.5 ppm en el espectro de RMN-¹H y 40 ppm en el espectro de RMN-¹³C corresponden a los protones presentes en las moléculas de DMSO, solvente utilizado en la ejecución de la técnica. Las señales correspondientes al DMSO aparecen a pesar de haber utilizado DMSO-d₆ (deuterado) en la técnica, posiblemente debido a un efecto de intercambio de protón con el DMSO-d₆ que generó DMSO-d₅. Como se mencionó en la sección de metodología, la multiplicidad de una señal en un espectro de RMN-¹H sigue la regla aritmética N+1, donde N representa el número de átomos de hidrógeno adyacentes al protón que generó la señal. Sin embargo, esta regla solo aplica para protones con spin de ½, mientras que el deuterio posee un spin de 1. Por esta razón, para predecir la multiplicidad de una señal de deuterio en el espectro de RMN-¹H se debe emplear una regla más general, esta es: 2(I)N+1, donde I es el spin del deuterio (I=1) y N sigue representando el mismo valor. Aplicando esta regla podemos explicar la multiplicidad de pentaplete del DMSO-d₅, debido a que uno de los metilos presentara dos hidrógenos y un deuterio. Tomando estos datos, sustituyéndolos en la formula, y resolviéndola se vería de la siguiente manera: 2(1)(2)+1= 5. Para explicar la aparición del heptaplete del DMSO-d₅ en el espectro de RMN-¹³C, el enfoque utilizado debe ser el mismo, utilizar la fórmula 2(I)N+1. Sin embargo, en este caso N no representa el número de carbonos vecinos sino el número de protones al que está unido el carbono que generó la señal. En este caso el sustituir los datos en la formula y resolverla nos generaría el siguiente resultado: 2(1)(3)+1= 7. Con estos resultados podemos confirmar que las señales que ignoramos en el

proceso de elucidación estructural corresponden a residuos de solventes y no al compuesto en cuestión.

5.3.2 Elucidación estructural de B-05

La caracterización del híbrido de isatina B-05 fue, en parte, muy similar a la del compuesto previo, ya que algunas señales mantuvieron su desplazamiento químico y/o multiplicidad, por lo que la asignación de señales en ambos espectros de resonancia magnética nuclear se llevó a cabo de una manera sencilla.

El espectro de RMN-¹H inició con una señal de singulete localizada en 2.36 ppm que integraba para tres protones (Ha) correspondiente al grupo metilo del anillo aromático de la porción de p-toluensulfonilhidrazida. A desplazamientos más elevados, en la región de protones aromáticos se pudieron apreciar cinco señales: un doblete en 6.89 ppm que integró para 1 protón, con una constante de acoplamiento de 7.8 Hz y que se asignó al protón aromático Hb en orto con respecto al nitrógeno de la amida; un triple de doblete en 7.04 ppm que integró para 1 protón, con constantes de acoplamiento de 7.64 Hz y 0.84 Hz y que se asignó al protón aromático Hc en para con respecto al nitrógeno de la amida; un triple de doblete en 7.34 ppm que integró para 1 protón, con constantes de acoplamiento de 7.8 Hz y 1.2 Hz y que se asignó al protón aromático Hd en para con respecto al grupo imino; un multiplete en 7.43 ppm que integró para 3 protones y que se asignó a los dos protones aromáticos (He) en orto con respecto al metilo y al protón aromático (He) en orto con respecto al grupo imino; y un doblete en 7.86 ppm que integró para 2

protones, con constante de acoplamiento de 8.24 Hz y que se asignó a los dos protones aromáticos (Hf) en meta con respecto al metilo. Finalmente, en la última región del espectro, a campos más bajos, se presentaron las últimas dos señales: un singulete en 11.23 ppm que integró para 1 protón, y que se asignó al protón de la amida (Hg); y un singulete ancho en 12.52 ppm que integró para 1 protón, y que fue asignado al protón de la hidrazida (Hh) (véase la figura 37).

Estas señales coinciden con la estructura esperada, ya que la integración total del espectro de RMN-¹H fue de 13 protones, el mismo número de estos esperado para B-05. La discusión de las señales del espectro girara en torno a las diferencias de B-05 con respecto a B-01, ya que, a nivel estructural, B-05 solo difiere en la incorporación de la porción de p-toluensulfonilhidrazida. La primera diferencia en el espectro de B-05 es la aparición de un multiplete en 7.43 ppm con respecto al doblete en 7.36 ppm de B-01. En el caso de B-05, se asumió que el multiplete observado es el resultado del solapamiento de dos dobletes: uno correspondiente al protón He en orto con respecto al grupo imino y el otro debido al acoplamiento de los protones aromáticos He en orto con respecto al metilo con los protones en meta con respecto al mismo. Esta asunción se debió a que se tomó el multiplete como dos dobletes separados, uno de mayor y otro de menor intensidad, se calcularon las constantes de acoplamiento, y se obtuvieron valores de 8 Hz y 7.68 Hz, respectivamente. Al comparar estos valores con otras constantes de acoplamiento presentes en el espectro podemos observar una similitud con la señal de los dos protones Hf en meta con respecto al metilo, y el protón Hc en para con respecto al nitrógeno de la amida, dándonos indicios de un acoplamiento entre protones con

constantes similares. Además, este multiplete integró para 3 protones, lo que respalda el hecho del solapamiento de los dos dobletes mencionados. En lo que respecta al desplazamiento químico de los protones de este multiplete podemos observar que se encuentra desplazado a campo bajo con respecto a los protones aromáticos de la porción de isatina, esto debido a que ninguno de los protones que conforman el multiplete presentan el efecto de apantallamiento del nitrógeno, y aunque, los protones del anillo aromático de la porción de p-toluensulfonilhidrazida presentan al grupo activador metilo, el efecto apantallador de este es mínimo comparado con el del nitrógeno de la amida debido a la deslocalización de electrones en el anillo aromático que el nitrógeno puede efectuar.

En el espectro de B-05, también se observó la aparición de un doblete en 7.86 ppm, este correspondía a la señal de los dos protones aromáticos en meta con respecto al grupo metilo. Este doblete se asignó como la última señal de la región aromática debido al enorme efecto de desapantallamiento que ejerce el grupo sulfonilhidrazida en comparación con el grupo imino.

Finalmente, se pudo apreciar la aparición de un singulete ancho correspondiente al protón de la sulfonilhidrazida. Para entender porque este protón fue la señal más desplazada a campo bajo se tiene que discutir acerca de las propiedades de este dentro de la molécula. Al igual que en las sulfonamidas, este protón es ácido debido a la gran estabilización por resonancia de la carga negativa resultante luego de su disociación. Además, debido a que el enlace N – H esta polarizado por la mayor electronegatividad del nitrógeno, la densidad electrónica sobre el átomo de hidrógeno disminuye, conduciendo a un efecto de desapantallamiento fuerte.

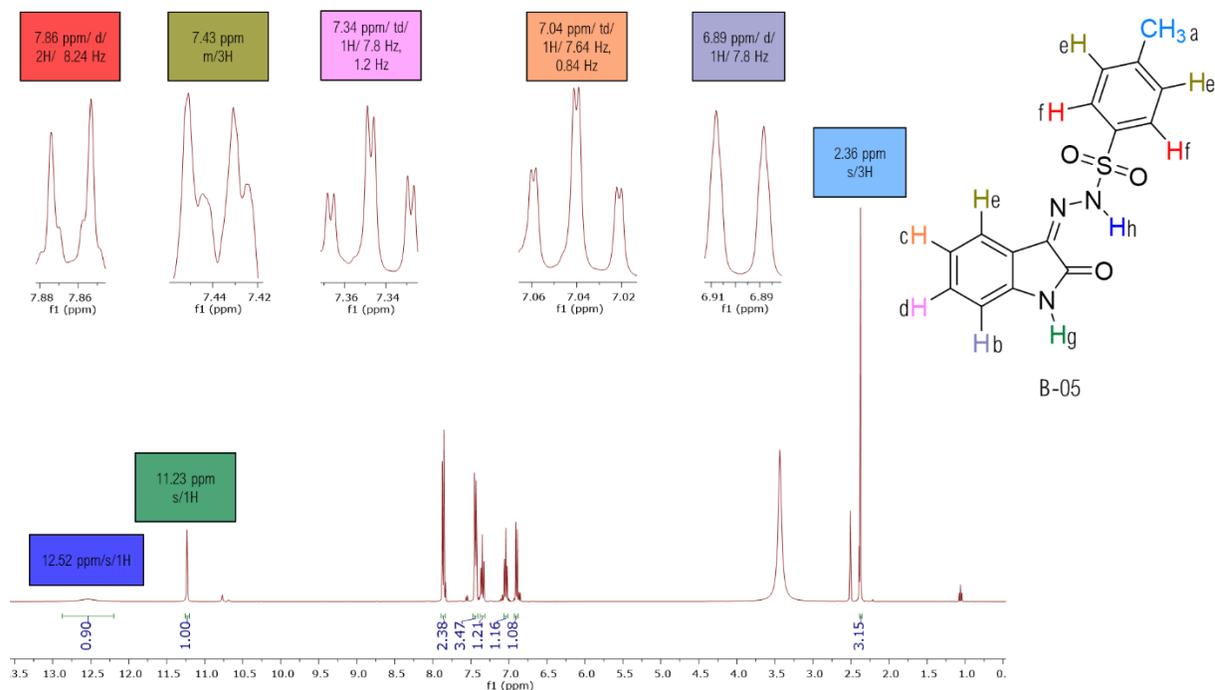


Figura 37. Espectro de RMN-¹H de B-05 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración, y constantes de acoplamiento de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO-d₆ como solvente.

La caracterización estructural de B-05 utilizando el espectro de RMN-¹³C también demostró que la síntesis fue un éxito en la obtención esta molécula. Las dos señales más importantes en esta afirmación son los singuletes presentes en 21 ppm y 162 ppm correspondientes a los carbonos de los grupos metilo de la porción de p-toluensulfonilhidrazida y carbonilo de la amida de la porción de isatina, respectivamente. Estas señales confirman la unión de las dos materias primas. De cualquier manera, a continuación, se describirán las señales obtenidas en el espectro de RMN-¹³C, su desplazamiento químico y su integración (cuando corresponda).

El espectro inició con una señal presente en 21 ppm correspondiente al carbono C1 del grupo metilo, desplazado de su rango normal (10 – 15 ppm) debido al efecto inductivo del anillo aromático, que actúa como un grupo electroattractor. Posteriormente, en la región de carbonos aromáticos podemos observar la presencia de 11 señales singulete, cada una correspondiente a un carbono de la molécula con excepción de los singuletes presentes en 128 ppm y 130 ppm que integran para dos carbonos, y se asignaron a los carbonos aromáticos C6 y C7 de la porción de p-toluensulfonilhidrazida, respectivamente. Las señales presentes en 111 ppm, 119 ppm, 121 ppm, y 122 ppm se asignaron a los carbonos C2, C3, C4, y C5, respectivamente, y se mantuvieron con un desplazamiento químico similar a los observados en la molécula B-01. A pesar de que todos estos son carbonos aromáticos los carbonos C6 y C7 se desplazaron a campo bajo debido a que el grupo metilo tiene un efecto de apantallamiento bajo en comparación con el nitrógeno de la amida, y el efecto de desapantallamiento de la sulfonilhidrazida es más fuerte comparado con el grupo imino. Posteriormente, se observaron dos señales en 132 ppm y 135 ppm que se asignaron al carbono C8 en meta con respecto al nitrógeno de la amida y al carbono C9 del carbonilo del grupo imino, respectivamente. A desplazamientos más elevados se identificaron otras tres señales en 137 ppm, 143 ppm y 145 ppm que se asignaron a los carbonos C10, C11 y C12, en ese orden. Estos eran carbonos aromáticos sustituidos que presentaban efectos de desapantallamiento debido a los efectos electrónicos de sus sustituyentes, conduciéndolos a un desplazamiento elevado, incluso más que el carbono del grupo imino. Finalmente, se observó una señal en 162 ppm que se asignó al carbono del carbonilo de la amida (véase la figura 38).

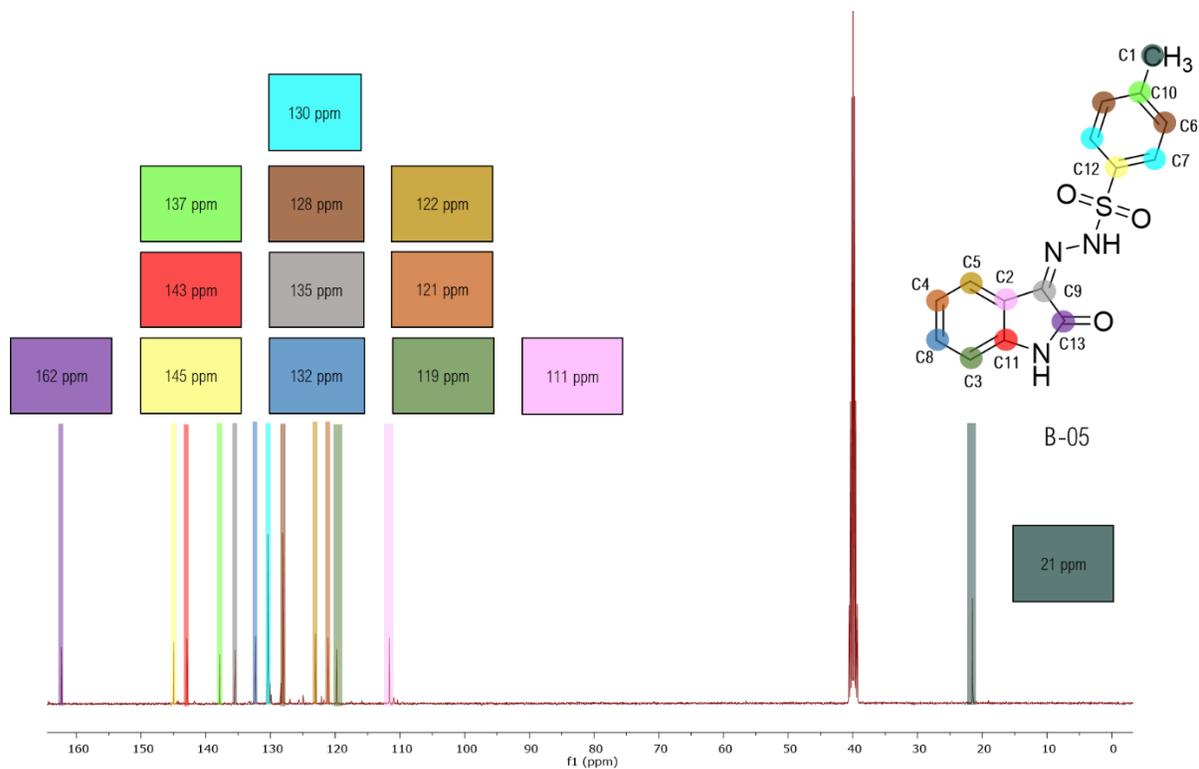


Figura 38. Espectro de RMN- ^{13}C de B-05 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. Es importante observar que las señales de 128 ppm y 130 ppm integran, cada una, para dos carbonos. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO- d_6 como solvente.

De la misma manera que para B-01, durante la elucidación estructural de B-05 se omitió el tomar en cuenta las señales de los solventes residuales en los espectros de RMN- ^1H y RMN ^{13}C .

5.3.3 Elucidación estructural de B-09

Para finalizar con los resultados y la discusión de la elucidación estructural, se mostrarán los resultados y discusión de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C concernientes a la molécula B-09, la tercera plataforma híbrida de isatina.

El espectro de RMN-¹H de B-09 inició con una señal de doblete en 6.92 ppm que integró para 2 protones, con una constante de acoplamiento de 7.8 Hz, y que fue asignada al protón Ha. Posteriormente, se presentaron dos señales de triple de doblete en 7.02 ppm y 7.42 ppm, ambas señales integrando para 2 protones, y fueron asignadas a los protones Hb y Hc, en ese orden. Las constantes de acoplamiento para los protones Hb y Hc (cada protón presentó dos) fueron de 7.62 Hz y 0.66 Hz, y 7.74 Hz y 1.18 Hz, respectivamente. A desplazamientos más de altos de 7.52 ppm se identificó a un doblete que integró para 2 protones y cuya constante de acoplamiento fue de 7.48 Hz. Esta señal se asignó al protón Hd en orto con respecto al grupo imino. Finalmente, en 11.02 ppm se observó la última señal del espectro, un singulete que integró para 2 protones. Esta señal se asignó al protón de la amida (véase la figura 39).

A través de estas señales, su desplazamiento químico, integración y constantes se confirmó la estructura de B-09. Debido a que B-09 es un híbrido simétrico de dos moléculas de isatina las señales de los protones aromáticos en un anillo serán química y magnéticamente equivalentes. Por este motivo, en el espectro solo se aprecian cinco señales, a pesar del gran número de protones en la molécula. Además, la integración de cada señal es de 2 protones, confirmando así la

afirmación previa. Además, podemos observar que las señales poseen desplazamientos químicos y multiplicidades similares a la isatina. La única diferencia en el espectro de RMN-¹H de la molécula B-09 con respecto al de B-01, es la desaparición de las señales de los protones de la porción de hidrazina. Esto debido a que, en esta molécula, el grupo amino que estaba presente en B-01 se convirtió en un grupo imino mediante una adición nucleofílica a través de la reacción de formación de iminas, como se mencionó en la sección de metodología, y en la sección de resultados y discusión de la síntesis química.

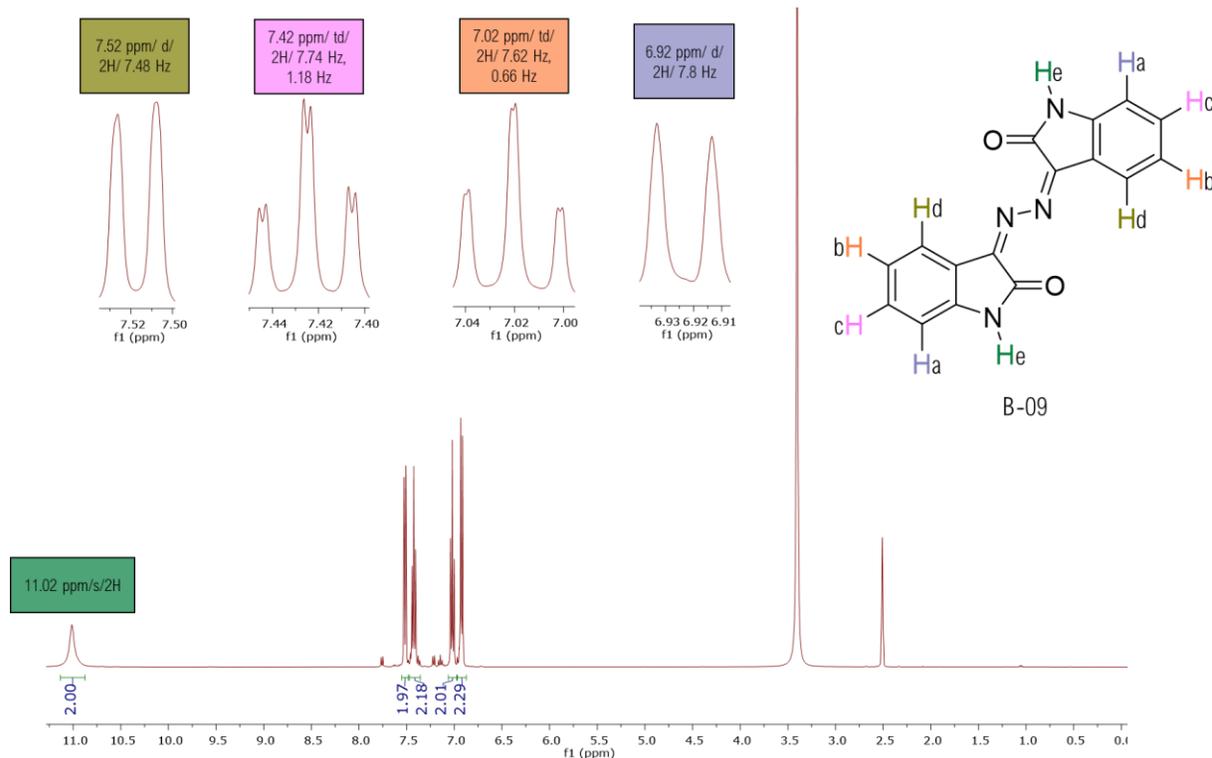


Figura 39. Espectro de RMN-¹H de B-09 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. Es importante observar que cada señal integra para dos protones debido a la simetría

de la molécula. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO- d_6 como solvente.

El espectro de RMN- ^{13}C comenzó con una señal en 111 ppm asignada al carbono C1 en orto con respecto al nitrógeno de la amida. Se observó la presencia de cuatro señales en 116 ppm, 122 ppm, 128 ppm y 134 ppm que se asignaron a los carbonos C2, C3, C4 y C5, en ese orden. La señal del carbono C6 del grupo imino se asignó al pico en 145 ppm, y en un desplazamiento un poco más elevado, 146 ppm, se encontró la señal asignada al carbono C7 aromático directamente unido al nitrógeno de la amida que, como se mencionó previamente, está altamente desplazado a campo bajo por el efecto inductivo del nitrógeno a causa de su electronegatividad. Finalmente, en 163 ppm se identificó la señal del carbono C8 correspondiente al carbono del carbonilo de la amida (véase la figura 40).

A través de la recolección de estas señales se pudo confirmar la formación del híbrido B-09, ya que las señales que se observaron son exactamente las de la molécula B-01, solo mostrando variaciones en los desplazamientos químicos de los carbonos C6 y C7. Estas variaciones se deben a los efectos electrónicos generados por la conjugación de los sistemas aromáticos y los grupos imino que se alcanzó en el híbrido B-09.

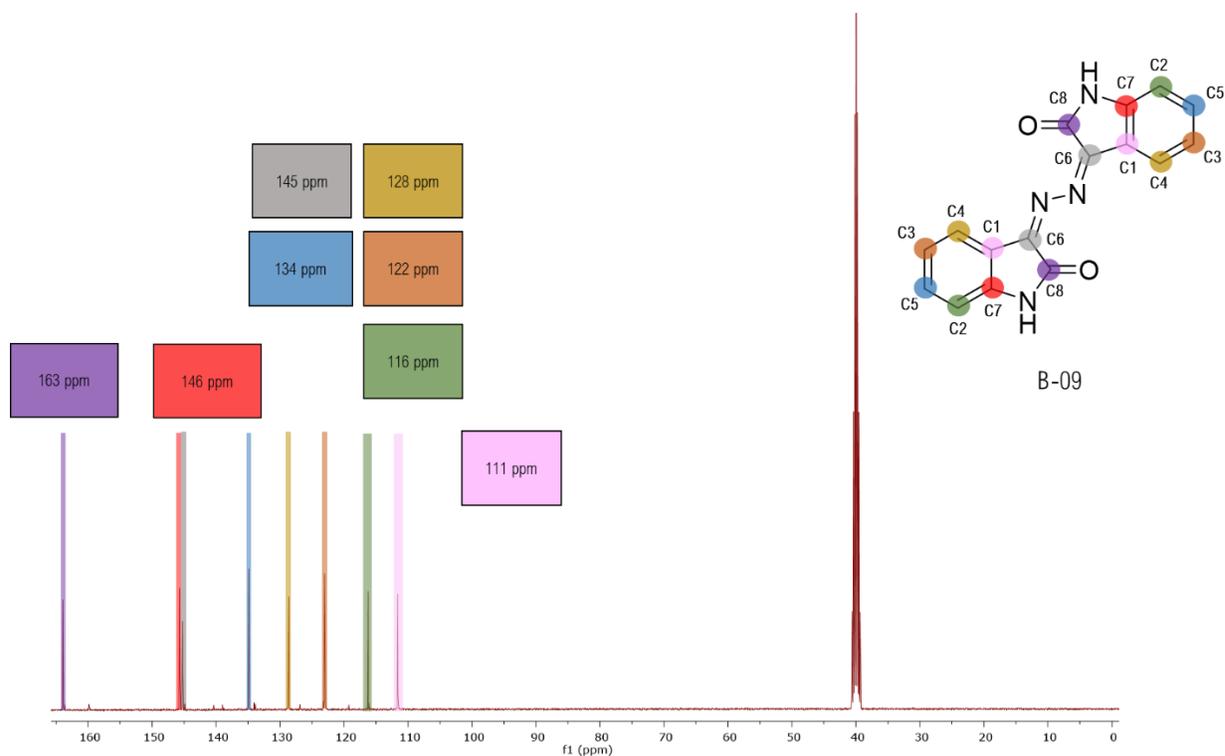


Figura 40. Espectro de RMN-¹³C de B-09 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO-d₆ como solvente.

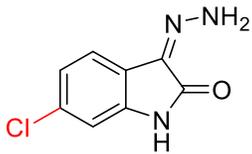
De la misma manera que en las dos moléculas pasadas, se pudo observar la presencia de señales provenientes de los solventes residuales, sin embargo, estos no se tomaron en cuenta para el proceso de elucidación estructural.

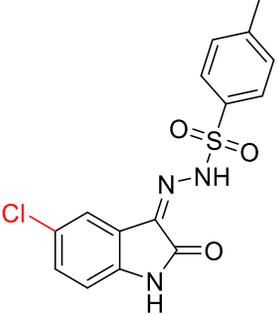
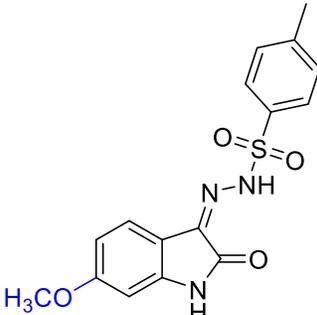
5.3.4 Elucidación estructural de B-02, B-06, y B-08

Para finalizar con la etapa de elucidación estructural, a continuación, se mencionarán las señales obtenidas en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C para los compuestos B-02, B-06 y B-08. Cabe mencionar que se evitará discutir los

desplazamientos, la multiplicidad o la asignación, ya que estos valores son variaciones de los ya discutidos para sus plataformas correspondientes, B-01 y B-05. Además, estos datos se pueden consultar en la sección de apéndices relacionada a la elucidación estructural. En la tabla 13 se mencionan dichos valores mostrando en la primera columna la clave y estructura del compuesto, y en la segunda y tercera columna las señales obtenidas en los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, respectivamente.

Tabla 14. Señales obtenidas de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C de los híbridos de isatina B-02, B-06 y B-08.

Clave/Compuesto	Señales del RMN- ¹ H	Señales del RMN- ¹³ C
 <p>B-02</p>	10.82 ppm (s, 1H, N-H), 10.66 ppm (d, J=14.8 Hz, 1H, N-H), 9.87 ppm (d, J=14.88 Hz, 1H, N-H), 7.32 ppm (d, J=2.04 Hz, 1H, Ar- H), 7.17 ppm (dd, J=8.32 Hz, J=2.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.86 ppm (d, J=8.36 Hz, 1H, Ar-H).	163 ppm (C=O), 137 ppm (ArC), 126.8 ppm (ArC), 126.17 ppm (C=N), 125 ppm (ArC), 124 ppm (ArC), 117 ppm (ArC), 110 ppm (ArC).
	12.49 ppm (sa, 1H, N-H), 11.32 ppm (s, 1H, N-H), 7.89 ppm (d, J=8.32 Hz, 2H, Ar-H), 7.45 ppm (m,	162 ppm (C=O), 144 ppm (ArC), 141 ppm (ArC), 137 ppm (ArC), 135 ppm (ArC), 131 ppm (C=N),

 <p style="text-align: center;">B-06</p>	<p>3H, Ar-H), 7.37 ppm (dd, J=8.32 Hz, J=2.2 Hz, 1H), 6.89 ppm (d, J=8.32 Hz, 1H, Ar-H), 2.37 ppm (s, 3H).</p>	<p>130 ppm (ArC), 130 ppm (ArC), 128 ppm (2C, ArC), 127 ppm (2C, ArC), 121 ppm (ArC), 120 ppm (ArC), 113 ppm (ArC), 21 ppm (CH₃).</p>
 <p style="text-align: center;">B-08</p>	<p>12.34 ppm (s, 1H, N-H), 11.18 ppm (s, 1H, N-H), 7.84 ppm (d, J=8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.43 ppm (d, J=8.12 Hz, 2H, Ar-H), 7.35 ppm (d, J=8.44 Hz, 1H, Ar-H), 6.58 ppm (m, 1H, Ar-H), 6.42 ppm (d, J=2.08 Hz, 1H, Ar-H), 3.76 ppm (s, 3H, CH₃), 2.36 ppm (s, 3H, CH₃).</p>	<p>163 ppm (C=O), 162 ppm (ArC), 144.8 ppm (ArC), 144.7 ppm (ArC), 137 ppm (ArC), 135 ppm (C=N), 130 ppm (2C, ArC), 127 ppm (2C, ArC), 122 ppm (ArC), 112 ppm (ArC), 108 ppm (ArC), 97 ppm (ArC), 56 ppm (OCH₃), 21 ppm (CH₃).</p>

5.4 Resultados y discusión de la evaluación de citotoxicidad

Una vez se sintetizaron los compuestos que se plantearon en el diseño de los híbridos de isatina, y su estructura fue caracterizada por métodos espectroscópicos, se llevó a cabo la evaluación de la citotoxicidad de estos en dos líneas celulares

inmortalizadas, MCF-7 y PC-3, y una línea celular no inmortalizada, VERO. Como se planteó en la sección de metodología, la evaluación de citotoxicidad en cada línea celular inició con una evaluación general de los compuestos sintetizados, la isatina, y el 2-Oxoindol (una estructura similar) a una concentración de 100 μM con DMSO al 0.5% utilizando el ensayo colorimétrico del WST1. La evaluación citotóxica para cada compuesto se llevó a cabo por triplicado dentro de cada placa (triplicado biológico) y, a su vez, cada ensayo se realizó por triplicado en tres días diferentes (triplicado técnico). Aquellos compuestos que disminuyeron la viabilidad celular por debajo del 50% a esta concentración se consideraron activos, y se exploró más en su actividad biológica al determinar su IC_{50} . Todas las evaluaciones citotóxicas de los compuestos se acompañaron de tres controles: células con medio, células con medio y DMSO, y células con medio, DMSO y lapatinib. La prueba estadística que se utilizó para analizar los resultados fue la prueba de Kruskal-Wallis. Existieron dos motivos para seleccionar esta prueba: 1) la distribución de los datos colectados no era normal y 2) la naturaleza de las variables. Una vez detectadas diferencias estadísticas con la prueba de Kruskal-Wallis, se procedió a realizar una prueba post-hoc para identificar las diferencias por parejas entre todos los grupos analizados.

A continuación, se describen y se discuten los resultados de las evaluaciones generales e IC_{50} de las líneas celulares utilizadas.

5.4.1 Evaluación general en la línea celular MCF-7

La evaluación general de los compuestos que se sintetizaron y dos estructuras análogas se llevó a cabo en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama a una concentración de 100 μM , siendo solo un híbrido de isatina, el B-09, citotóxico para esta línea celular con un porcentaje de viabilidad celular observada cercano al 10%. Por otro lado, todos los híbridos restantes mostraron porcentajes de viabilidad celular superiores al 90% y no hubo diferencia estadística significativa entre ellos. Dicho de otro modo, estos compuestos no mostraron actividad anticancerígena prometedora enfocándonos solo en términos de citotoxicidad. Además, podemos observar la citotoxicidad elevada del lapatinib (control positivo), un inhibidor de tirosín cinasas, en las células MCF-7 mostrando un porcentaje de viabilidad celular por debajo del 1% a la misma concentración. Sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa entre B-09 y lapatinib a 100 μM en la línea celular MCF-7 ($P > 0.05$), aunque este último sí fue estadísticamente diferente al resto de los híbridos de isatina ($P < 0.05$).

En la figura 41 se muestran los resultados de citotoxicidad de la evaluación general de los compuestos sintetizados, la isatina, el 2-oxoindol, y lapatinib de manera gráfica. Todos estos resultados determinados a 100 μM con DMSO al 0.5% con el ensayo colorimétrico del WST1.

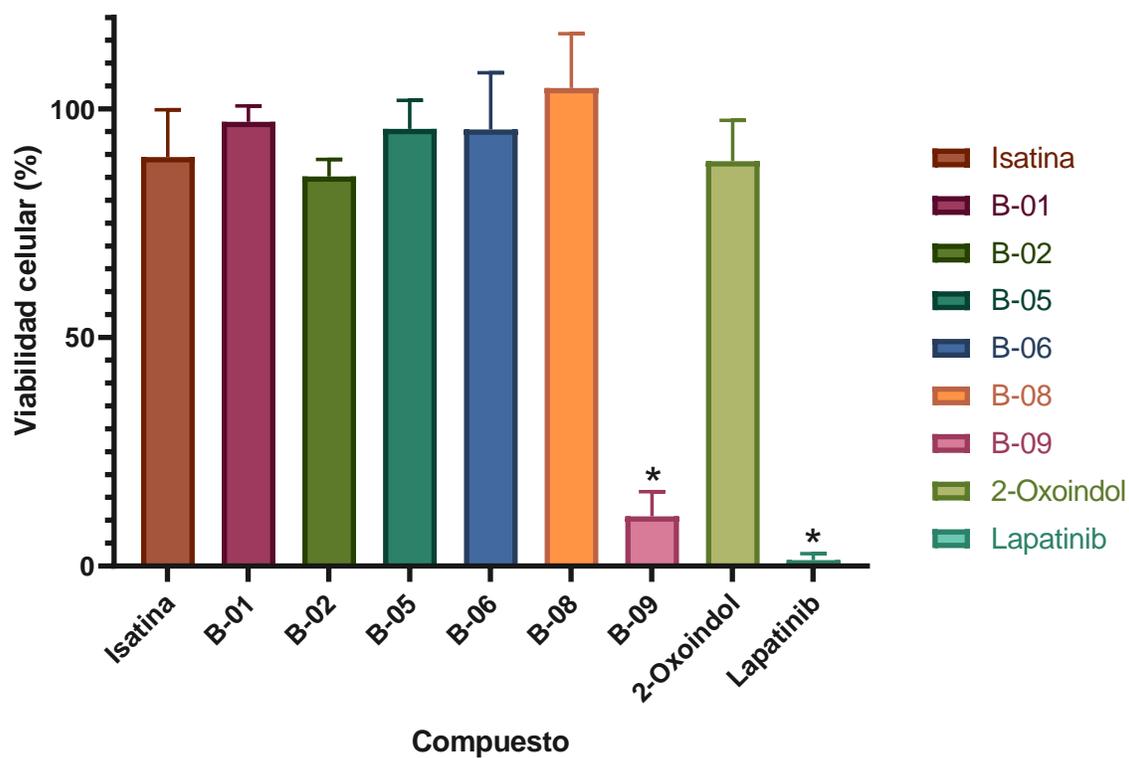


Figura 41. Evaluación general de los híbridos de isatina en la línea celular MCF-7.

* $P < 0.05$

Con base en estos resultados se decidió indagar más en la actividad citotóxica del compuesto B-09, identificar su IC_{50} y comparar este resultado con el del control positivo, lapatinib.

5.4.2 Determinación del IC_{50} de B-09 y lapatinib en MCF-7

Se llevó a cabo la determinación del IC_{50} de B-09 y lapatinib en MCF-7 de la misma manera que en la evaluación general, a través del método del WST1. Para este

ensayo se utilizó una serie de cinco concentraciones para cada compuesto a evaluar, y el ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Los resultados muestran un comportamiento lineal para la curva de citotoxicidad del lapatinib, y un IC_{50} calculado de $53.85 \mu M$. Por otro lado, la curva de citotoxicidad del compuesto B-09 muestra un comportamiento ligeramente exponencial, y un IC_{50} calculado de $22.65 \mu M$. Podemos observar, por ende, que B-09 fue más citotóxico para las células cancerosas de la línea MCF-7 que el lapatinib (véase la figura 42).

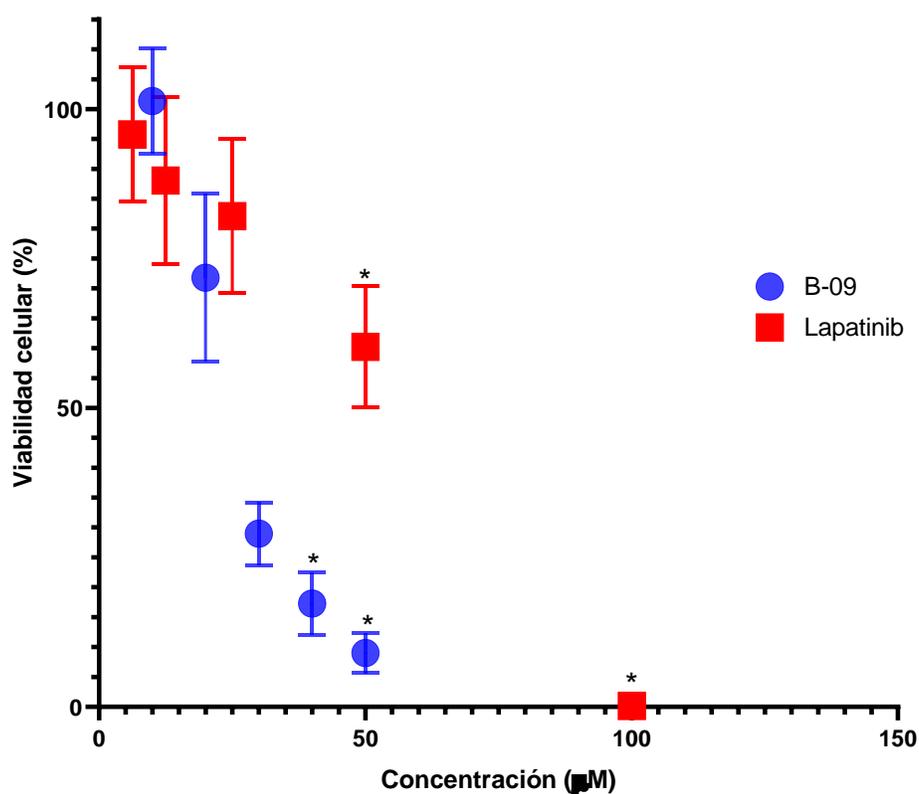


Figura 42. Determinación del IC_{50} de B-09 y lapatinib en la línea celular MCF-7.

* $P < 0.05$

5.4.3 Evaluación general en la línea celular PC-3

Los híbridos de isatina también se evaluaron en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata. Se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad iniciando con una evaluación general de los híbridos de isatina a una concentración de 100 μM . Lamentablemente, el compuesto B-09 volvió a ser el único híbrido bioactivo en términos de citotoxicidad, con un porcentaje de viabilidad del 17% y con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). Por este motivo se decidió indagar más en su actividad a través de su rango de concentraciones, y calcular su IC_{50} (véase la figura 43).

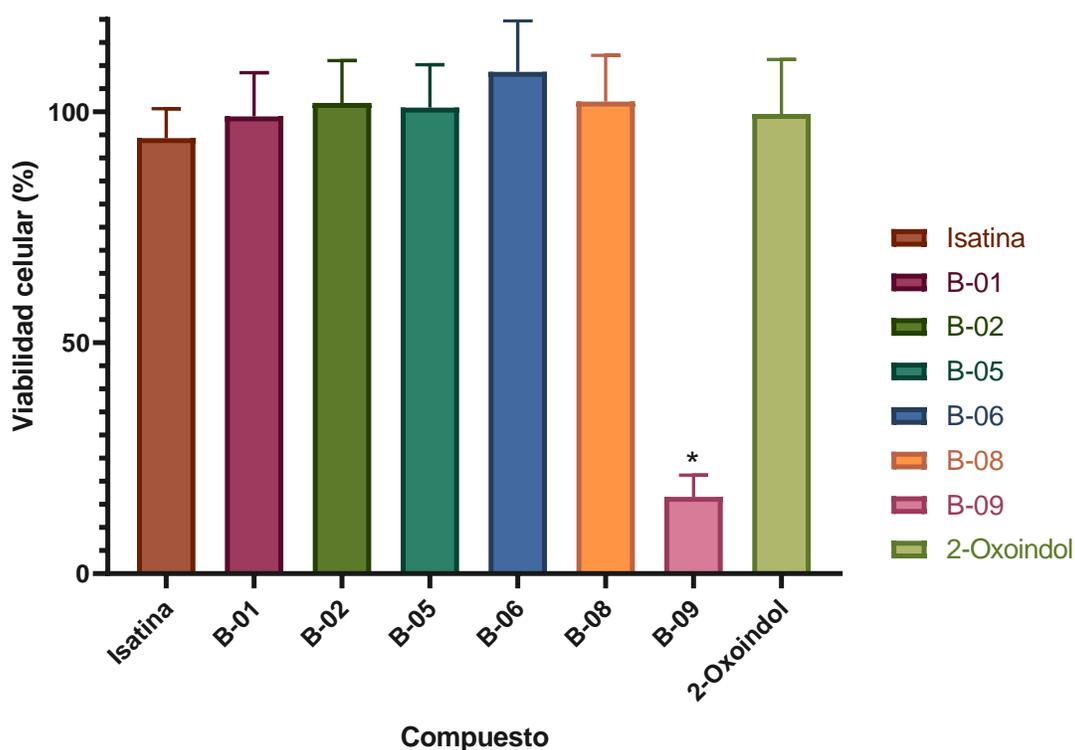


Figura 43. Evaluación general de los híbridos de isatina en la línea celular PC-3.

* $P < 0.05$

5.4.4 Determinación del IC₅₀ de B-09 en PC-3

Se evaluó la actividad anticancerígena del compuesto B-09 en la línea celular PC-3 mediante una serie de diluciones seriadas iniciando en 100 μM y terminando en 6.25 μM . Cada concentración se llevó a cabo por cuadruplicado. Los resultados de la determinación del IC₅₀ del compuesto B-09 se muestran de manera gráfica en la figura 44. El IC₅₀ calculado para B-09 fue de 39.85 μM . De acuerdo con el análisis estadístico solo las concentraciones de 50 μM y 100 μM fueron diferentes con significancia estadística ($P < 0.05$) al resto de las concentraciones, pero no hubo diferencia estadística entre ellas.

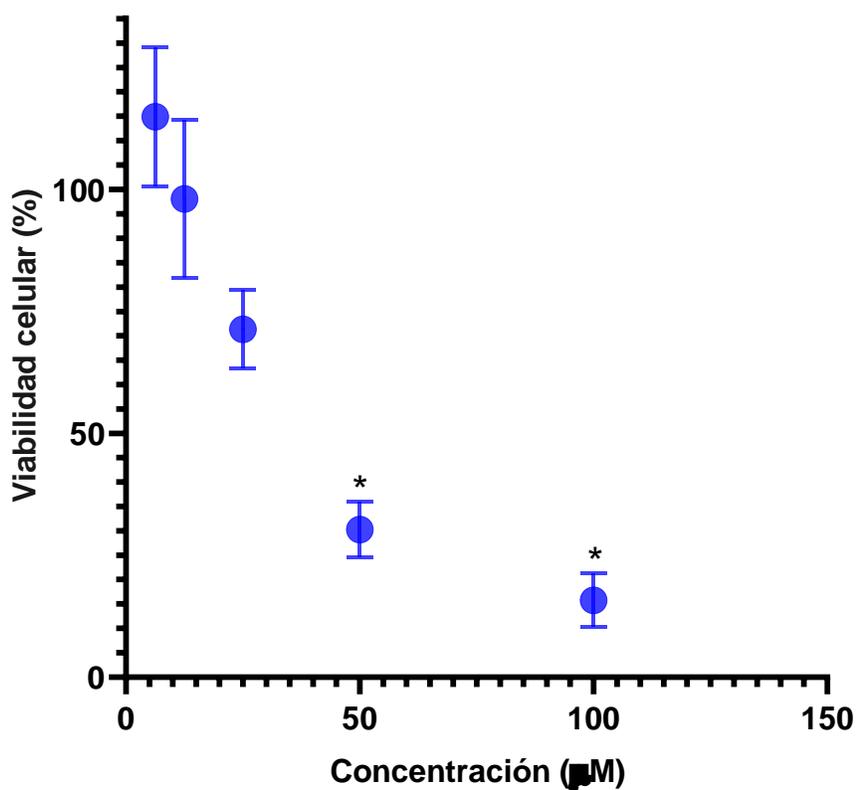


Figura 44. Determinación del IC₅₀ de B-09 en la línea celular PC-3. * $P < 0.05$

5.4.5 Evaluación general en la línea celular VERO

Toda la serie de compuestos evaluados previamente en las líneas inmortalizadas, posteriormente, se evaluaron en la línea celular no inmortalizada, VERO, para determinar su efecto citotóxico en células consideradas “normales”. De esta manera, una vez determinada la citotoxicidad de los compuestos en las líneas inmortalizadas y no inmortalizadas, se observó la selectividad de estos.

Los resultados de la evaluación general de los compuestos sintetizados, los análogos estructurales y el lapatinib mostraron una nula citotoxicidad hacia la línea celular VERO a 100 μ M. Todos los porcentajes de viabilidad celular de estos compuestos (incluyendo al lapatinib) superaban el 90% y no hubo diferencia estadística entre ellos ($P > 0.05$). La única excepción a la regla fue el compuesto B-09, cuyo porcentaje de viabilidad celular fue del 12% y fue estadísticamente diferente al resto ($P < 0.05$). Por este motivo, se decidió determinar el IC_{50} de B-09 por separado. A continuación, se muestran, de manera gráfica, en la figura 45 los resultados obtenidos en la evaluación general.

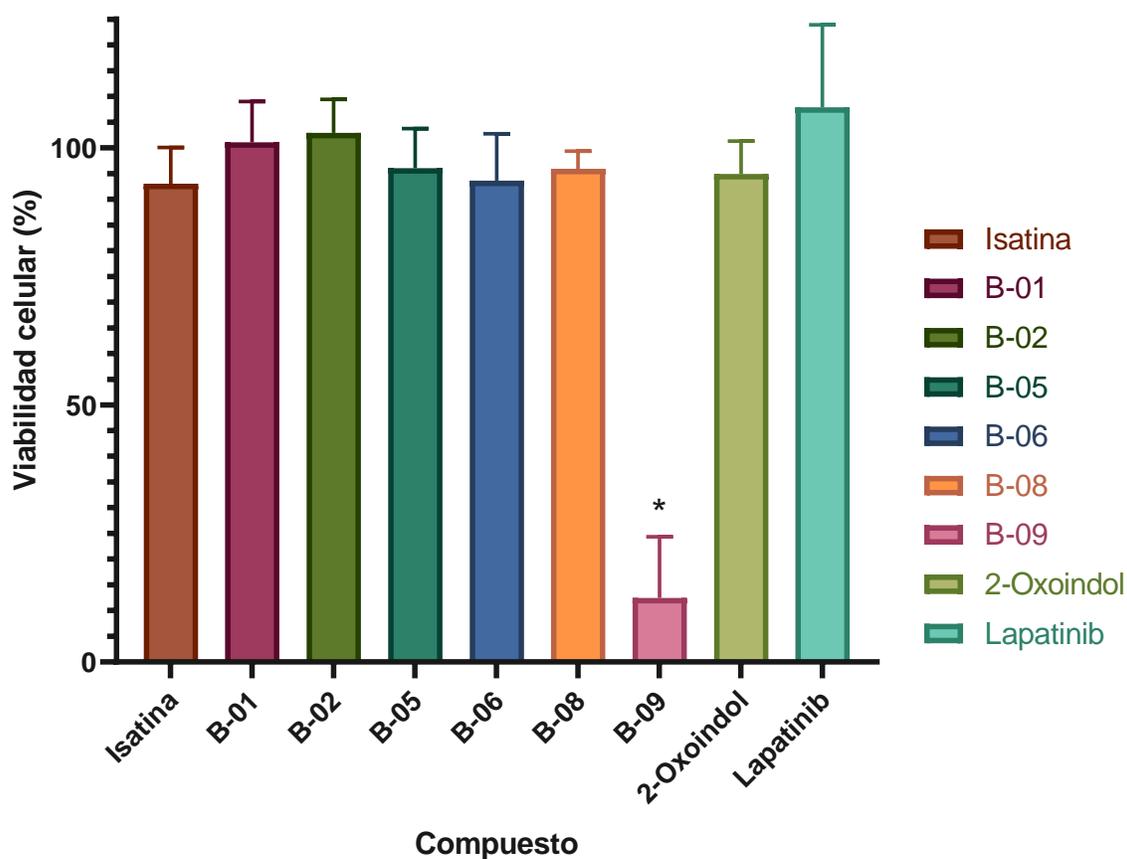


Figura 45. Evaluación general de los híbridos de isatina en la línea celular VERO.

* $P < 0.05$

5.4.6 Determinación del IC_{50} de B-09 en VERO

El IC_{50} del compuesto B-09 en las células VERO se determinó de la misma manera que para las líneas celulares previas, utilizando una dilución seriada de 5 concentraciones e iniciando en 50 μM . Los resultados mostraron que la curva de citotoxicidad de B-09 tiene un comportamiento lineal, lo cual contrasta con su

comportamiento exponencial en las líneas inmortalizadas (véase la figura 46). El IC_{50} calculado para esta curva de concentraciones fue de $37.71 \mu\text{M}$.

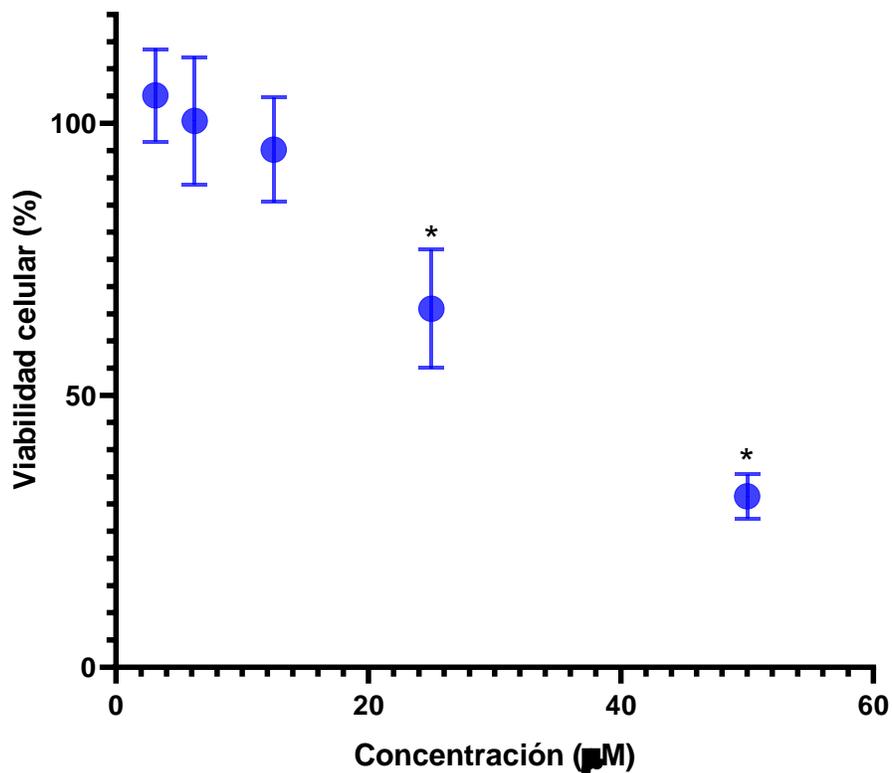


Figura 46. Determinación del IC_{50} de B-09 en la línea celular VERO. * $P < 0.05$

De acuerdo con el análisis estadístico, las concentraciones de $50 \mu\text{M}$ y $25 \mu\text{M}$ fueron diferentes estadísticamente con respecto a las demás ($P < 0.05$), sin embargo, no hubo diferencia estadística entre ellas ($P > 0.05$).

5.4.7 Análisis de la actividad biológica de los híbridos de isatina

Los ensayos de citotoxicidad suelen ser el primer tipo de pruebas que se llevan a cabo al momento de evaluar a nivel preclínico moléculas nuevas. A pesar de que, a lo largo del presente proyecto, se han mencionado las distintas limitaciones de estos ensayos, su aplicación rápida y sencilla para conocer la capacidad citotóxica de distintos compuestos sobre diferentes líneas celulares sigue siendo de utilidad puesto que, al momento de buscar conocer el perfil biológico de una molécula, la citotoxicidad es un parámetro importante. Por este motivo, a manera de un primer estudio exploratorio sobre el perfil biológico de los híbridos de isatina sintetizados, se decidieron llevar a cabo ensayos de citotoxicidad antes de proseguir con otros ensayos más específicos en proyectos futuros, con base en los resultados obtenidos aquí.

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad se pudo apreciar que el único compuesto con actividad citotóxica en las distintas líneas celulares utilizadas fue B-09. Este resultado concuerda con lo observado en el acoplamiento molecular, donde los compuestos desde B-05 hasta B-09, presentaban energías de afinidad más altas y por ende eran más afines y específicos por algunas de las dianas moleculares evaluadas, principalmente CDK2, GSK3 β y CDK1. De acuerdo con Hassan *et al.* el híbrido de isatina HB1b (véase la figura 11) condujo a la represión de las proteínas ciclina B1 y CDK1 en células HepG2.⁹⁰ Por este motivo, podría ser posible que los efectos citotóxicos del compuesto B-09 se den a través de la inhibición de CDK2, con la consecuente

disminución en la expresión de la ciclina B1, o la inhibición directa de CDK1 acompañado con la ciclina B1.¹⁰⁸

Además, con base en los resultados del acoplamiento molecular, y a la similitud estructural de las moléculas diseñadas en el presente proyecto y aquellas diseñadas por Bramson *et al.* esperábamos, al igual que con B-09, que los híbridos B-05, B-06 y B-08 presentaran una actividad citotóxica a través de la inhibición de CDK2 o CDK1.⁸⁸ Sin embargo, dichos compuestos mostraron una baja citotoxicidad, presentando IC₅₀ mayores de 100 µM. Este comportamiento se podría deber al cambio estructural que se llevó a cabo en el proyecto, en el que el grupo sulfonilamino era el que estaba implicado directamente en la unión de los diferentes farmacóforos a diferencia de los compuestos reportados por Bramson *et al.* donde el grupo sulfonilamino estaba localizado en el anillo aromático en posición para con respecto al nitrógeno utilizado para la unión de los farmacóforos (véanse las figuras 9 y 24). Este cambio impacta radicalmente ya que en posición para, en el anillo aromático, el grupo sulfonilamino tiene la capacidad de establecer diferentes puentes de hidrógeno actuando tanto como aceptor y como donador de hidrógeno. Por otro lado, los compuestos B-05, B-06 y B-08 en la posición para del anillo aromático presentan un grupo metilo, cuya capacidad para establecer interacciones intermoleculares es nula en comparación con el grupo sulfonilamino.⁸⁸

En lo que respecta a los compuestos B-01 y B-02, su comportamiento coincidió con lo esperado por el acoplamiento molecular. De acuerdo con este análisis, los compuestos B-01 y B-02 mostraron energías de afinidad bajas y constantes de disociación altas hacia las dianas moleculares evaluadas, siendo esto característico

de los compuestos promiscuos. Además, estos compuestos no demostraron una actividad citotóxica elevada en ninguna línea celular evaluada ($IC_{50} >100 \mu M$), estando al mismo nivel y sin diferencia estadística con la isatina ($IC_{50} >100 \mu M$), la materia prima de estas moléculas. Incluso estas actividades biológicas coinciden con lo reportado por Moiseeva *et al.* en lo correspondiente a la citotoxicidad del I3C (la otra molécula base para su diseño) en la línea celular MCF-7, donde el IC_{50} calculado fue de $264 \mu M$. Todo estas observaciones, posiblemente, debido a la estructura simple y promiscua de B-01 y B-02, que no permiten la inhibición específica y potente de dianas moleculares esenciales para las células.

Otra explicación no tan alentadora de los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad involucra la estabilidad química de los sistemas imina presentes en los distintos híbridos de isatina sintetizados en el presente proyecto. El grupo imino es susceptible a la hidrólisis en condiciones ácidas y en condiciones donde existe un exceso de agua. Por este motivo, es posible que los compuestos B-01, B-05 y sus derivados pudieron haber experimentado una hidrólisis en el medio cultivo debido a la presencia de sustancias ácidas y el exceso de agua. A diferencia de estos compuestos, B-09 presenta dos grupos imino enlazados entre ellos por el nitrógeno, y a un anillo aromático cada uno por medio del carbono, lo que conlleva a la generación de un sistema conjugado que aporta estabilidad a la molécula por la deslocalización de electrones y, por ende, la vuelve menos reactiva hacia las reacciones de hidrólisis (véanse las figuras 23 - 25). De esta manera se explicaría, en términos químicos, porque solo el compuesto B-09 fue el único que presentó citotoxicidad en todas las líneas celulares evaluadas. Sin embargo, la degradación

de los compuestos en el medio de cultivo deberá confirmarse en proyectos posteriores.

Capítulo VI

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y REFERENCIAS

6.1 Conclusiones

A partir de los resultados que se discutieron en el capítulo pasado, se pudo llegar a la generación de muchas conclusiones. A continuación, se mencionan todas estas en forma de listado.

- Se llevó a cabo el diseño racional de nueve compuestos promiscuos utilizando los reportes de la literatura de los compuestos basados en isatina y mediante el uso de herramientas computacionales de predicción de dianas, acoplamiento y modelado molecular, y predicción de propiedades farmacocinéticas.
- A través de la reacción de formación de iminas con las condiciones establecidas en la sección de síntesis química, y utilizando el método de recristalización para purificar se pudieron sintetizar seis híbridos de isatina con rendimientos que iban desde buenos a moderados de manera rápida y sencilla. Aunque este método estuvo limitado a materias primas que carecieran de grupos activadores en el anillo aromático de la isatina.
- La caracterización estructural utilizando técnicas espectroscópicas como RMN-¹H y RMN-¹³C nos permitió confirmar la estructura química de los híbridos de isatina que se plantearon.
- Se evaluó la citotoxicidad de los híbridos de isatina sintetizados en las líneas celulares MCF-7, PC-3 y VERO. Con excepción del compuesto B-09, ninguna de las moléculas sintetizadas demostró actividad citotóxica. En el caso de los compuestos B-01 y B-02 se pudo deber a su similitud estructural con la isatina y

el indol-3-carbinol, sustancias reportadas como no citotóxicas. En el caso de los compuestos B-05 y B-06 se puede deber a la inversión estructural de la porción de bencenosulfonamida que se llevó a cabo en el proyecto, ya que el grupo sulfonilamino es un mejor farmacóforo que el grupo metilo.

- Solo el compuesto B-09 demostró actividad citotóxica contra las líneas celulares MCF-7 y PC-3 de cáncer de mama y próstata, respectivamente. Sin embargo, también mostró citotoxicidad contra la línea celular no inmortalizada VERO.
- Se rechaza la hipótesis ya que B-09 fue más citotóxico que lapatinib en la línea celular inmortalizada MCF-7 (aunque no en PC-3), como en la no inmortalizada línea celular VERO.

6.2 Perspectivas

Con todo lo mencionado anteriormente en el presente proyecto, surgen múltiples líneas de investigación para indagar de manera más profunda cada uno de los resultados obtenidos, con el afán de mejorar y avanzar en el diseño de los fármacos promiscuos basados en isatina.

A pesar de su baja citotoxicidad en las líneas celulares MCF-7 y PC-3, se deberían evaluar los compuestos B-01, B-02, B-05, B-06 y B-08 mediante otros ensayos tales como, ensayos de arresto del ciclo celular o ensayos de expresión génica como el microarreglo. Fármacos promiscuos como la metformina presentan citotoxicidades bajas en líneas inmortalizadas, pero debido a todo su repertorio de efectos metabólicos y de expresión génica, hoy en día es reconocido como un fármaco con aplicación en el tratamiento del cáncer. Como mencionó Sui Huang, “matar células tumorales mediante fármacos citotóxicos no es la mejor manera de tratar el cáncer”.⁷² Por este motivo, la utilidad de una molécula no puede definirse solo por pruebas citotóxicas *in vitro*.

De la misma manera, se deberían explorar más los efectos biológicos del compuesto B-09 con el objetivo de identificar su mecanismo de acción. Además, debido a que en términos de citotoxicidad fue el único compuesto activo, se debería diseñar una serie de derivados estructurales orientados a mantener su actividad anticancerígena, y mejorar su selectividad. Finalmente, se debería confirmar si existe o no la degradación de los híbridos de isatina en el medio de cultivo.

En cuanto a la parte sintética, se debería optimizar la reacción de formación de iminas para los compuestos B-03, B-04, B-07 y B-08, cuya síntesis no se dio o se dio con muy bajos rendimientos. Se deberían llevar a cabo pruebas utilizando sales de metales de transición como el cloruro de indio o un medio ácido en trazas que, se ha reportado, mejoran los rendimientos de las reacciones de formación de iminas. Además, los compuestos cristalizados se deberían someter a difracción de rayos X con el objetivo de obtener una estructura en 3D más exacta a la realidad, repetir las técnicas computacionales, y ganar una idea más clara de las interacciones que establecen los híbridos con las proteínas seleccionadas o las proteínas resultantes de los ensayos metabólicos o de expresión génica.

6.3 Apéndices

6.3.1 Modelado molecular

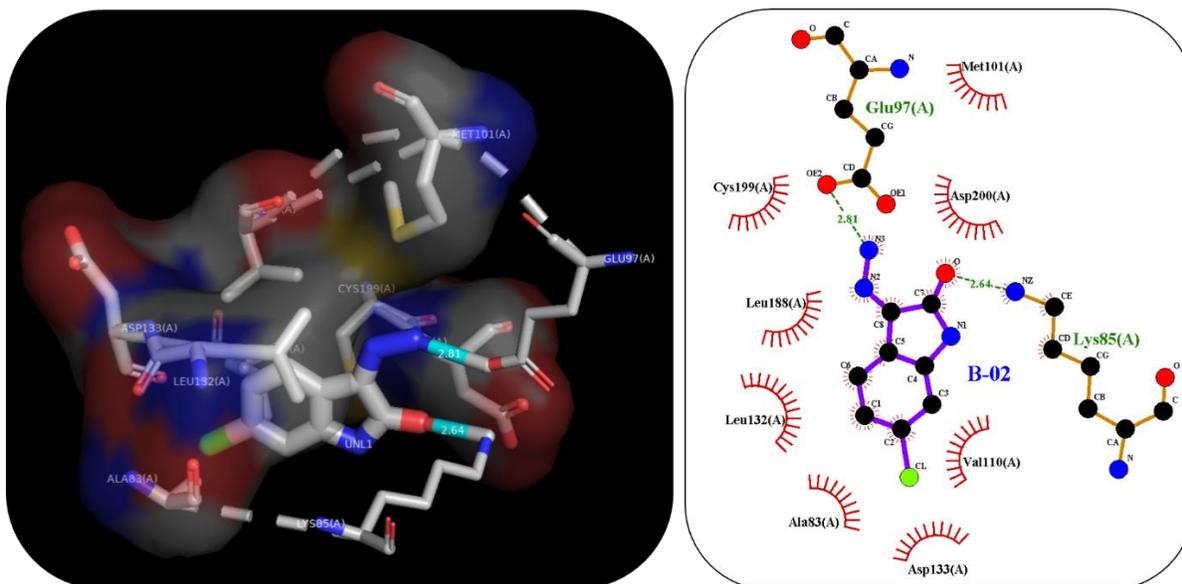


Figura 47. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-02 con la proteína cinasa GSK3β.

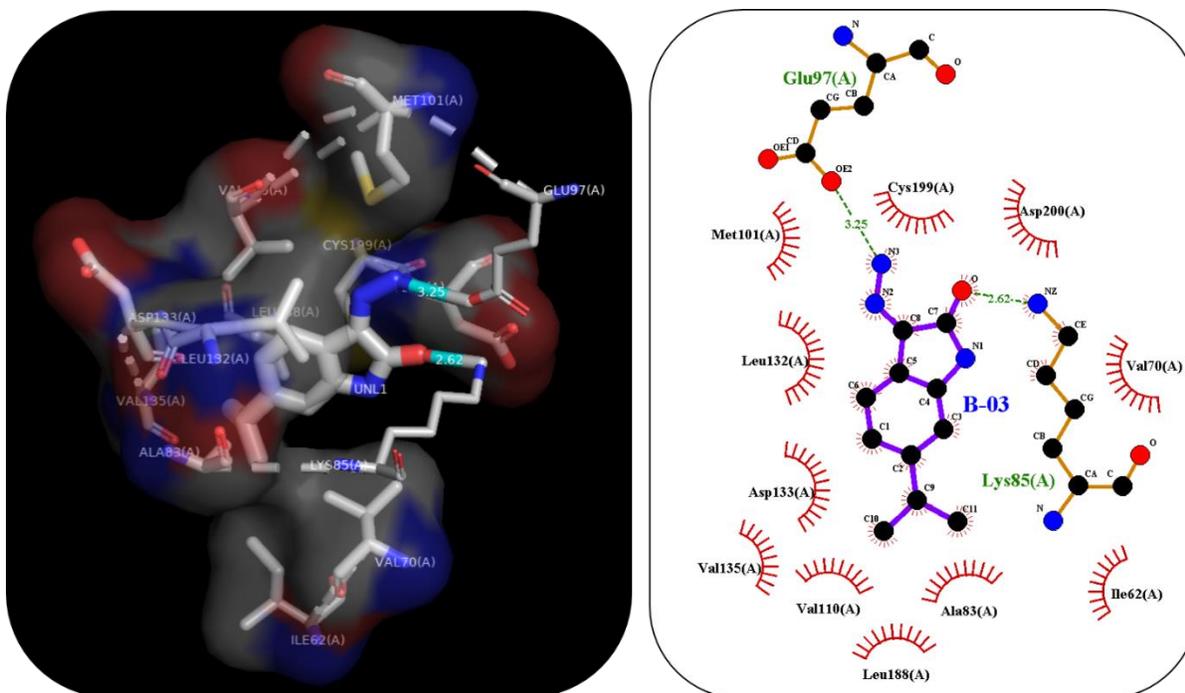


Figura 48. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-03 con la proteína cinasa GSK3β.

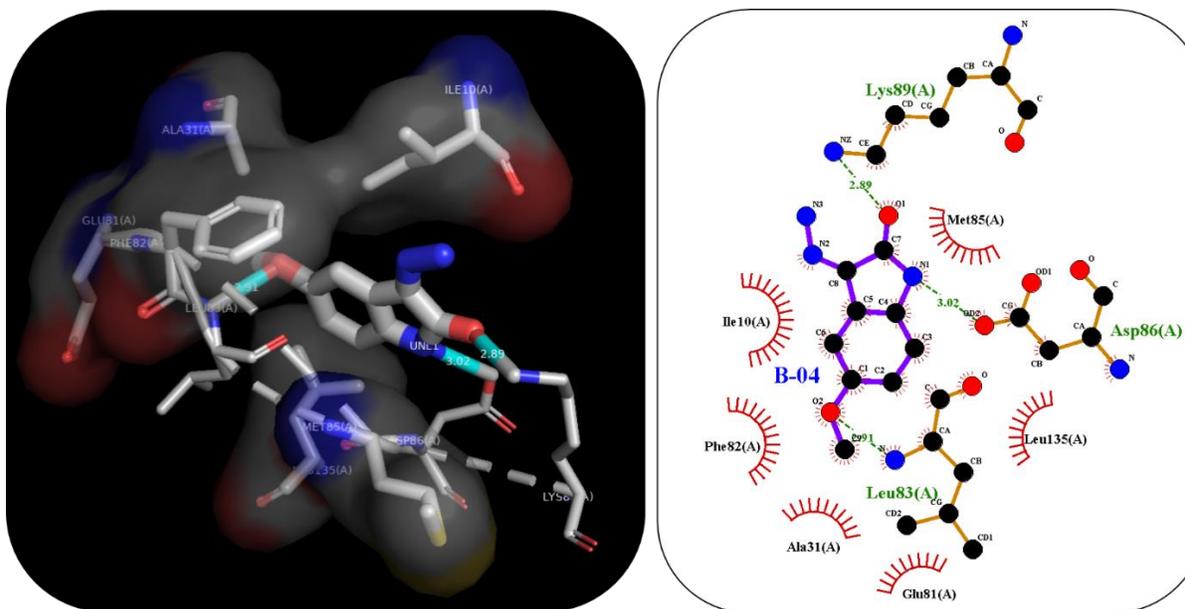


Figura 49. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-04 con la proteína cinasa CDK1.

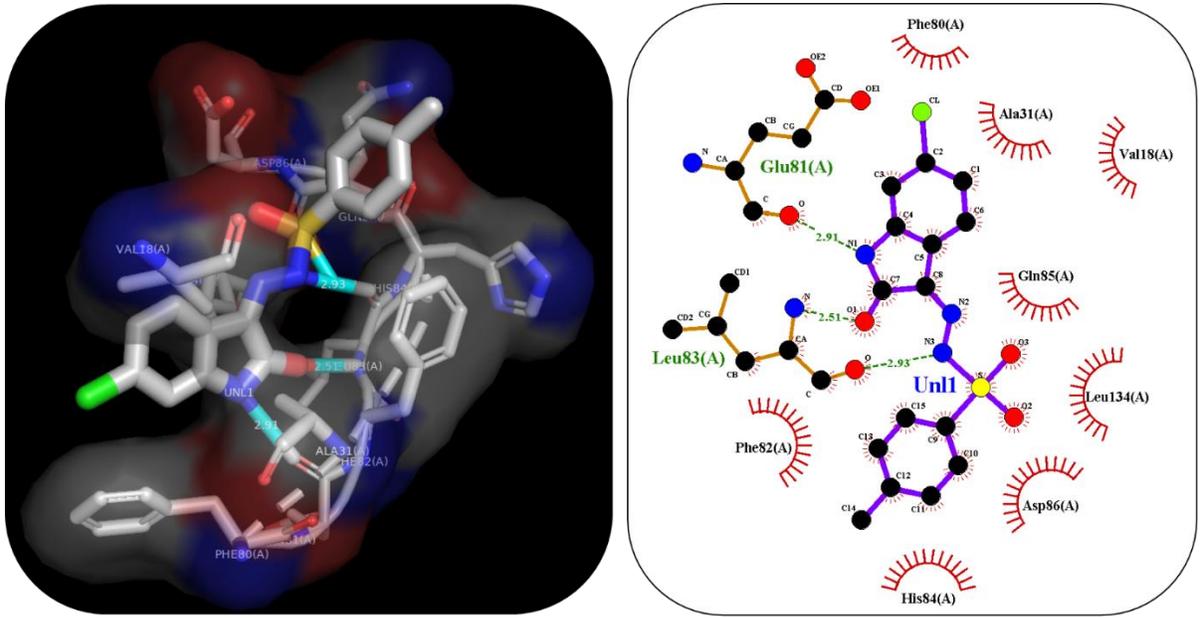


Figura 50. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-06 con la proteína cinasa CDK2.

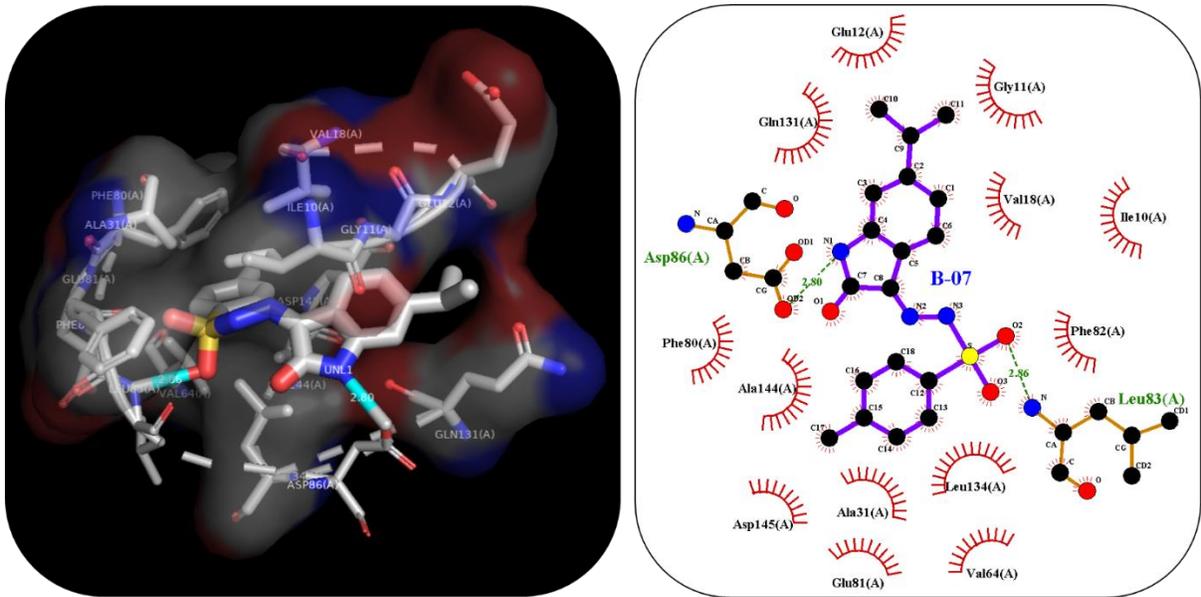


Figura 51. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-07 con la proteína cinasa CDK2.

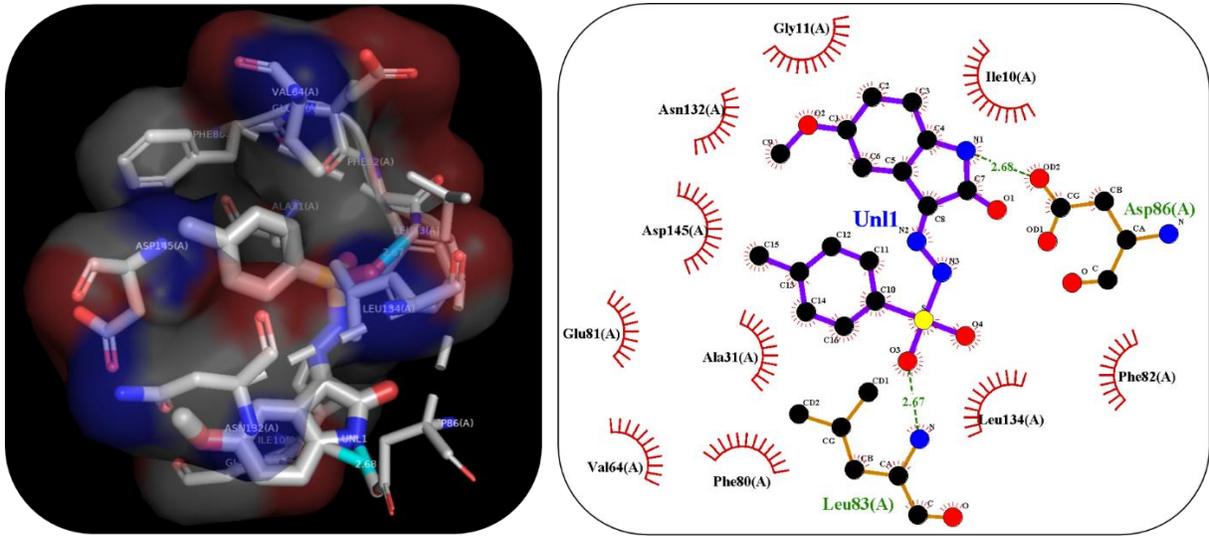


Figura 52. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) de B-08 con la proteína cinasa CDK2.

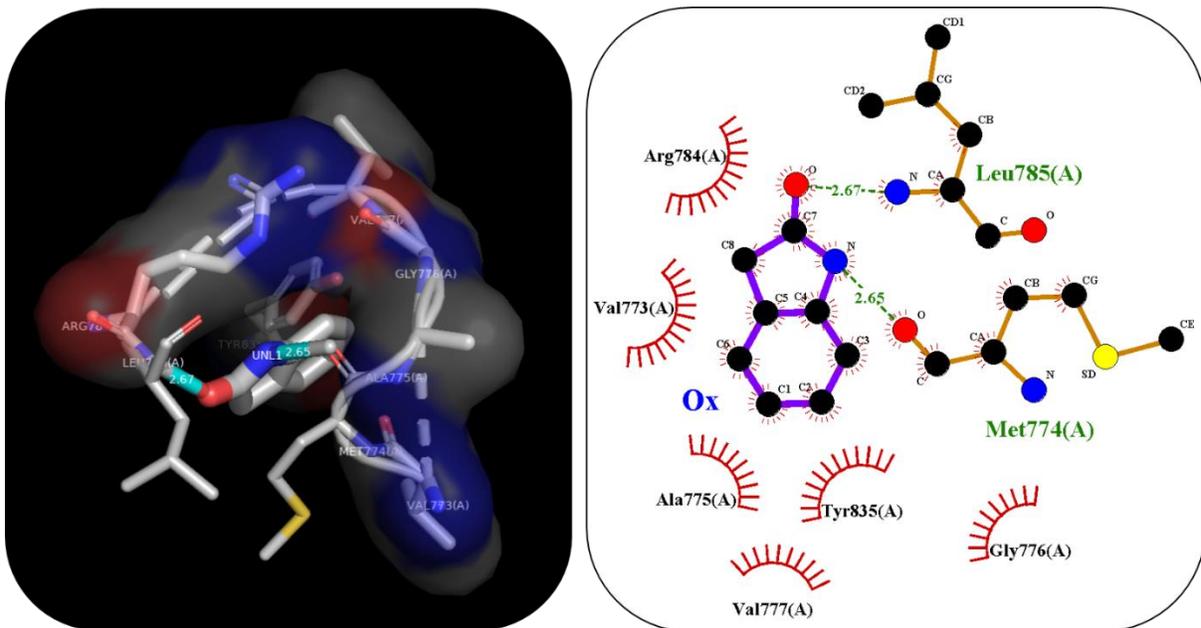


Figura 53. Modelado molecular en 3D (izquierda) y 2D (derecha) del 2-oxoindol con la proteína cinasa HER2.

6.3.2 Espectros de resonancia magnética de protón y carbono 13

a) Espectros de resonancia magnética de protón y carbono 13 de B-02

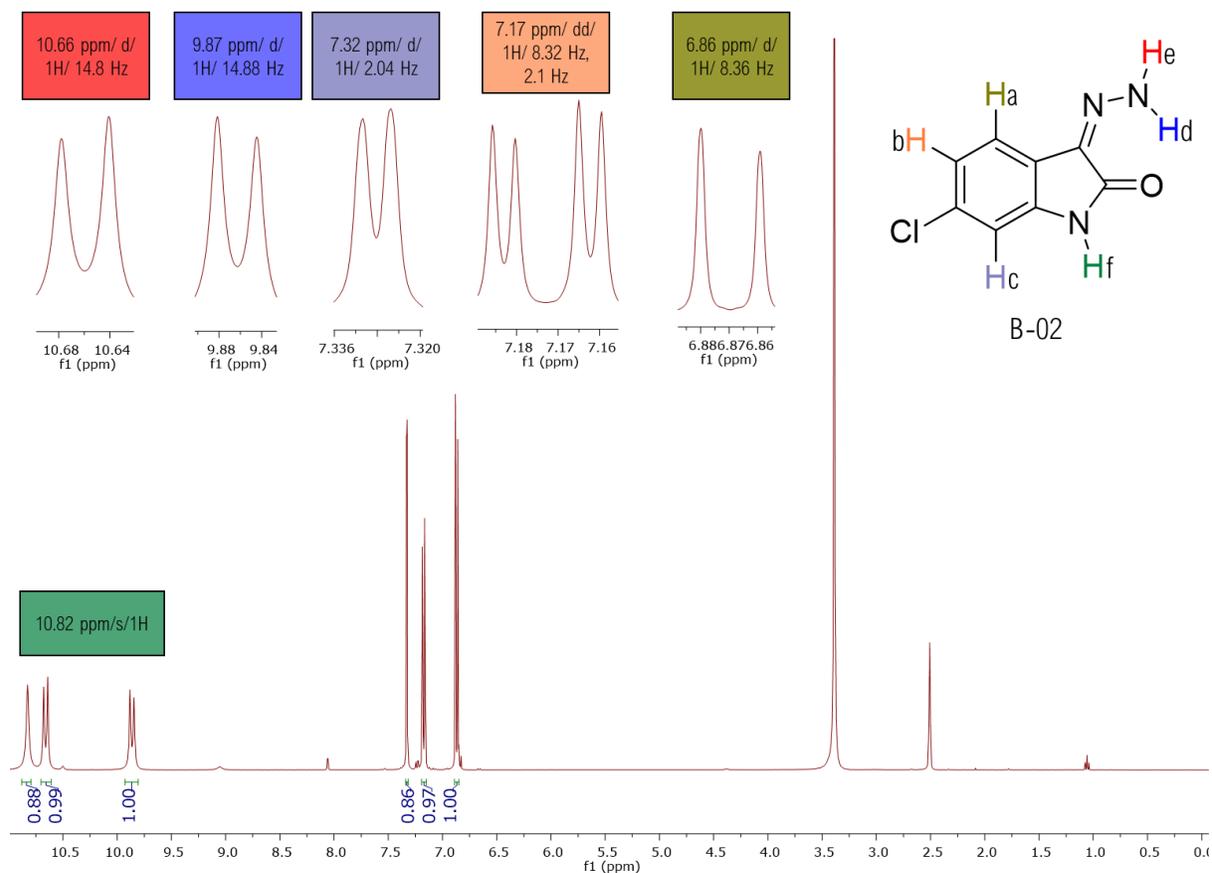


Figura 54. Espectro de RMN-¹H de B-02 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. Es importante observar que cada señal integra para dos protones debido a la simetría de la molécula. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO-d₆ como solvente.

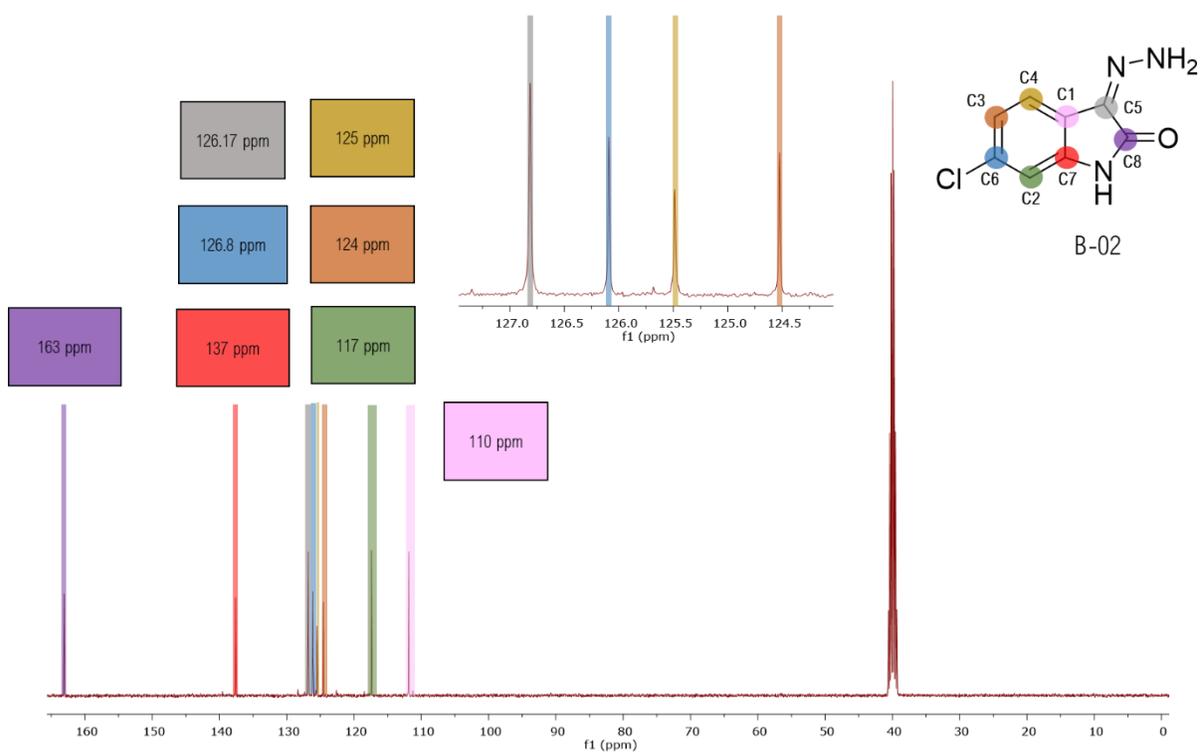


Figura 55. Espectro de RMN- ^{13}C de B-02 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO- d_6 como solvente.

b) Espectros de resonancia magnética de protón y carbono 13 de B-06

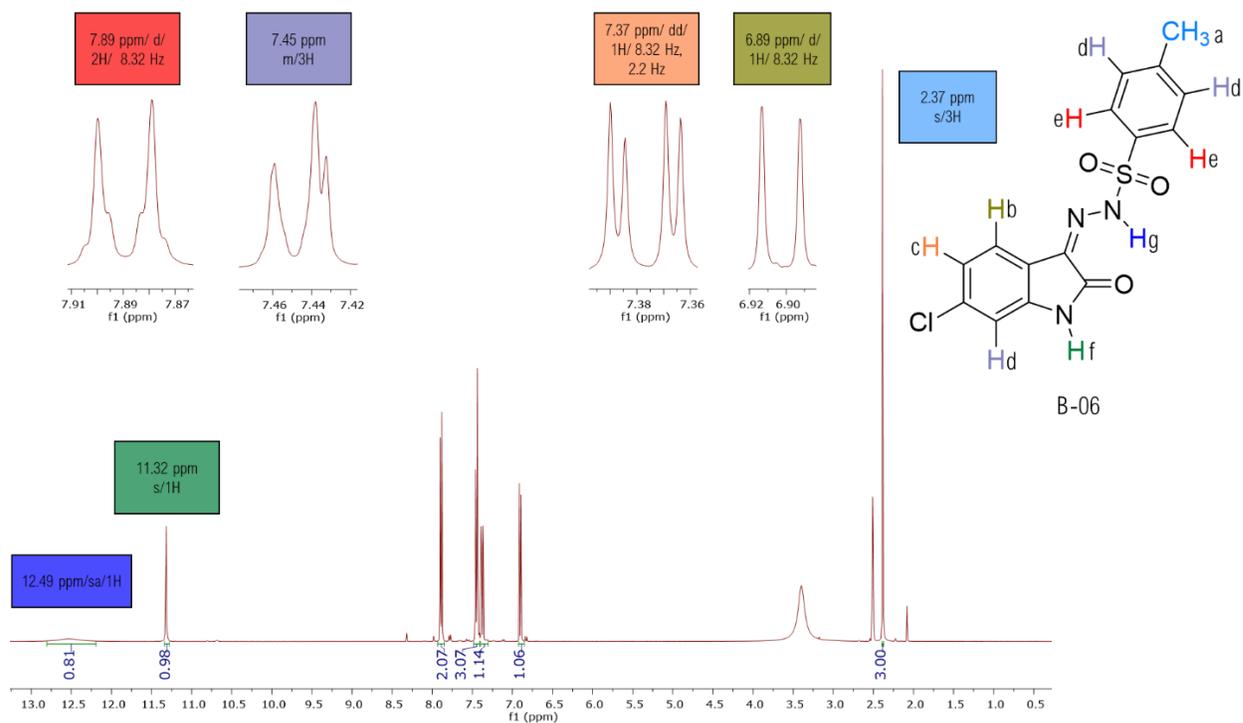


Figura 56. Espectro de RMN- ^1H de B-06 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. Es importante observar que cada señal integra para dos protones debido a la simetría de la molécula. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO- d_6 como solvente.

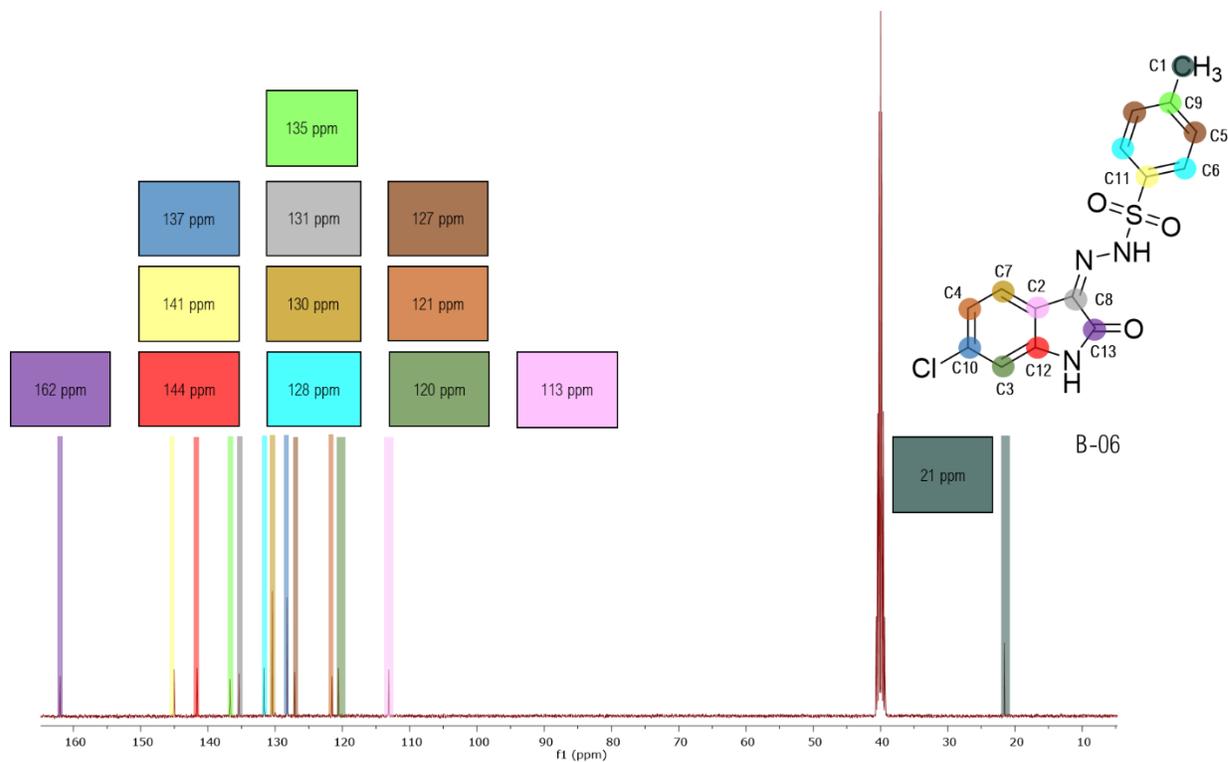


Figura 57. Espectro de RMN-¹³C de B-06 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO-d₆ como solvente.

c) Espectros de resonancia magnética de protón y carbono 13 de B-08

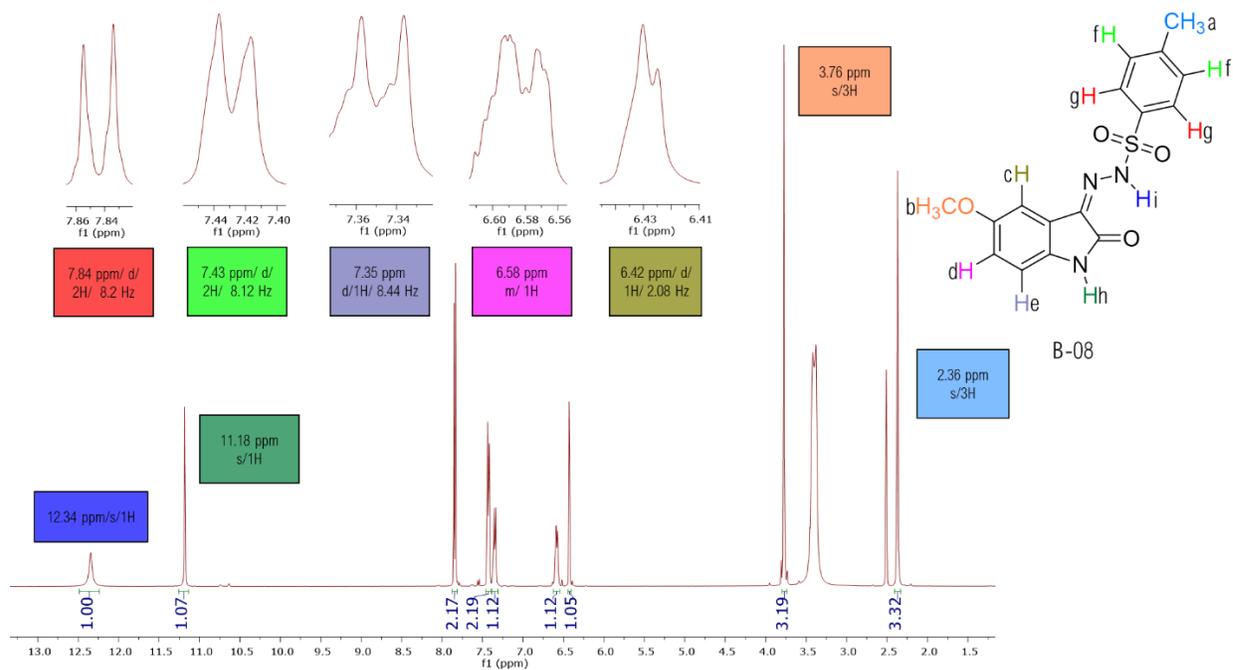


Figura 58. Espectro de RMN-¹H de B-08 donde se muestra el desplazamiento químico, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento de cada señal. Es importante observar que cada señal integra para dos protones debido a la simetría de la molécula. El espectro se corrió en un equipo a 400 MHz y utilizando DMSO-d₆ como solvente.

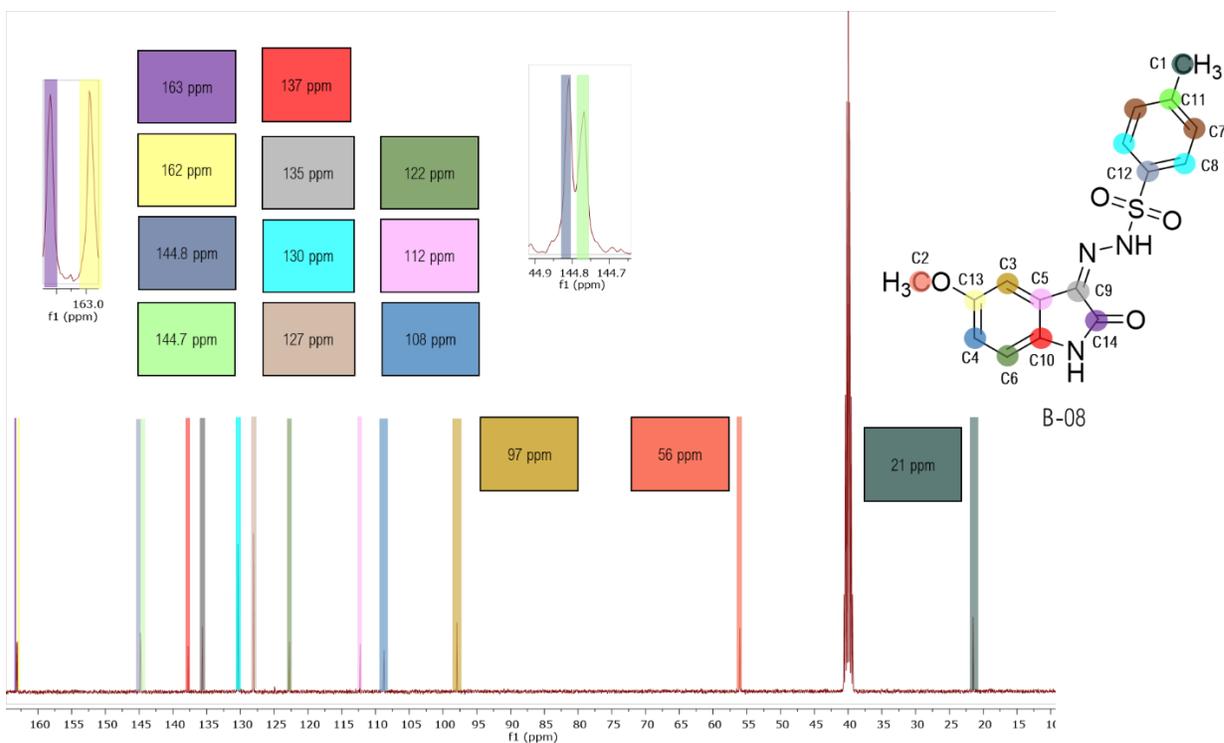


Figura 59. Espectro de RMN- ^{13}C de B-08 donde se muestra el desplazamiento químico de cada señal. El espectro se corrió en un equipo a 125 MHz y utilizando DMSO- d_6 como solvente.

6.4 Referencias

1. What Is Cancer? - National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
2. Factores de riesgo de cáncer - Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo>.
3. Cancer Today. http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&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_.
4. Cancer Tomorrow. <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>.
5. Anand, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* **25**, 2097–2116 (2008).
6. Cancers Associated with Overweight and Obesity Make up 40 percent of Cancers Diagnosed in the United States | CDC Online Newsroom | CDC. <https://www.cdc.gov/media/releases/2017/p1003-vs-cancer-obesity.html>.
7. ¿Cuánto cuesta atender el cáncer de mama en México? <https://www.forbes.com.mx/cuanto-cuesta-atender-el-cancer-de-mama/>.
8. Park, J. & Look, K. A. Health Care Expenditure Burden of Cancer Care in the United States. *Inquiry* **56**, (2019).
9. Cáncer y cambios en el sistema de salud - Instituto Mexicano para la Competitividad A.C. <https://imco.org.mx/temas/cancer-cambios-sistema-salud/>.
10. Takeuchi, T., Ichikura, K., Amano, K., Takeshita, W. & Hisamura, K. The degree of social difficulties experienced by cancer patients and their spouses. *BMC Palliat. Care* **17**, 1–9 (2018).

11. Schultz, M. Rudolf Virchow. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1479–1481 (2008).
12. Nickerson, N. K. *et al.* Decreased autocrine EGFR signaling in metastatic breast cancer cells inhibits tumor growth in bone and mammary fat pad. *PLoS One* **7**, (2012).
13. Nickerson, N. K., Mill, C. P., Wu, H. J., Riese, D. J. & Foley, J. Autocrine-derived epidermal growth factor receptor ligands contribute to recruitment of tumor-associated macrophage and growth of basal breast cancer cells in vivo. *Oncol. Res.* **20**, 303–317 (2013).
14. Guo, G. *et al.* Ligand-independent EGFR signaling. *Cancer Res.* **75**, 3436–3441 (2015).
15. Mitra, A. K. *et al.* Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha 5$ B1-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* **30**, 1566–1576 (2011).
16. Ueda, T., Mawji, N. R., Bruchovsky, N. & Sadar, M. D. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 38087–38094 (2002).
17. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
18. Toufektchan, E. & Toledo, F. The guardian of the genome revisited: P53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers (Basel)*. **10**, (2018).
19. Herrero, A. B., Rojas, E. A., Misiewicz-Krzeminska, I., Krzeminski, P. & Gutiérrez, N. C. Molecular mechanisms of p53 deregulation in cancer: An overview in multiple myeloma. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
20. Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. & Rotter, V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes and Cancer* **2**, 466–474 (2011).

21. Zhou, L. *et al.* Merlin-deficient human tumors show loss of contact inhibition and activation of Wnt/ β -catenin signaling linked to the PDGFR/Src and Rac/PAK pathways. *Neoplasia* **13**, 1101–1112 (2011).
22. Nicholson, L. B. The immune system. *Essays Biochem.* **60**, 275–301 (2016).
23. Jewett, A. & Tseng, H. C. Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells. *J. Cancer* **2**, 443–457 (2011).
24. Bernal, A. & Tusell, L. Telomeres: Implications for cancer development. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–21 (2018).
25. Ribatti, D., Tamma, R. & Annese, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl. Oncol.* **13**, 100773 (2020).
26. Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **13**, 395–412 (2018).
27. Zhang, Y. & Weinberg, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities EMT: a naturally occurring transdifferentiation program. *Front. Med.* **12**, 1–13 (2018).
28. Poltavets, V., Kochetkova, M., Pitson, S. M. & Samuel, M. S. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front. Oncol.* **8**, 1–19 (2018).
29. Krock, B. L., Skuli, N. & Simon, M. C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes and Cancer* **2**, 1117–1133 (2011).
30. Ferguson, L. R. *et al.* Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin. Cancer Biol.* **35**, S5–S24 (2015).
31. Andor, N., Maley, C. C. & Ji, H. P. Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance. *Cancer Res.* **77**, 2179–2185 (2017).
32. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.*

- 35**, 495–516 (2007).
33. Pistritto, G., Trisciuglio, 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)*. **8**, 603–619 (2016).
 34. Kim, S. Y. Cancer energy metabolism: Shutting power off cancer factory. *Biomol. Ther.* **26**, 39–44 (2018).
 35. Rodríguez-Enríquez, S. *et al.* Transcriptional Regulation of Energy Metabolism in Cancer Cells. *Cells* **8**, 1225 (2019).
 36. Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* **8**, 761–773 (2017).
 37. Weber, C. E. & Kuo, P. C. The tumor microenvironment. *Surg. Oncol.* **21**, 172–177 (2012).
 38. Zarrin, Bahare Zarifi, Farzane Vaseghi, Golnaz Haghjooy Javanmard, S. Acquired tumor resistance to antiangiogenic therapy - Mechanisms at a glance. *J. Res. Med. Sci.* **24**, (2019).
 39. Afify, S. M. & Seno, M. Conversion of stem cells to cancer stem cells: Undercurrent of cancer initiation. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–19 (2019).
 40. Hiyama, E. & Hiyama, K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br. J. Cancer* **96**, 1020–1024 (2007).
 41. Liau, B. B. *et al.* Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell* **20**, 233-246.e7 (2017).
 42. Surgery for Cancer - National Cancer Institute.
<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery>.
 43. Hwang, S. Y., Chang, S. J. & Park, B. W. Does chemotherapy really affect the quality of life of women with breast cancer? *J. Breast Cancer* **16**, 229–235 (2013).
 44. Miller, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. CA.

- Cancer J. Clin.* **69**, 363–385 (2019).
45. Tohme, S., Simmons, R. L. & Tsung, A. Surgery for cancer: A trigger for metastases. *Cancer Res.* **77**, 1548–1552 (2017).
 46. Radiation Therapy for Cancer - National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>.
 47. Jereczek-Fossa, B. A. *et al.* Radiotherapy-induced thyroid disorders. *Cancer Treat. Rev.* **30**, 369–384 (2004).
 48. Long-Term Toxicity of Radiation Therapy - Holland-Frei Cancer Medicine - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13384/>.
 49. L. Brunton, L., A. Chabner, B. & C. Knollmann, B. *Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (McGraw-Hill, 2018).
 50. Jiao, Q. *et al.* Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol. Cancer* **17**, 1–12 (2018).
 51. *Etoposide. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012).
 52. Long-Term Toxicity of Chemotherapy - Holland-Frei Cancer Medicine - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12584/>.
 53. Hanson, S. M. *et al.* What Makes a Kinase Promiscuous for Inhibitors? *Cell Chem. Biol.* **26**, 390-399.e5 (2019).
 54. Zhang, X. F., De-Sheng, L. V., Li, M., Sun, G. E. & Liu, C. H. A meta-analysis: Evaluation of safety and efficacy of the epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor monotherapy versus platinum-based doublets chemotherapy in East Asia. *Indian J. Cancer* **54**, 104–114 (2017).
 55. Qi, W. X. *et al.* Comparison of the efficacy and safety of EGFR tyrosine kinase inhibitor monotherapy with standard second-line chemotherapy in previously treated advanced non-small-cell lung cancer: A systematic review

- and meta-analysis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **13**, 5177–5182 (2012).
56. Hu, Y. & Bajorath, J. Compound promiscuity: What can we learn from current data? *Drug Discov. Today* **18**, 644–650 (2013).
 57. Antolin, A. A., Workman, P., Mestres, J. & Al-lazikani, B. Polypharmacology in Precision Oncology: Current Applications and Future Prospects. 6935–6945 (2016) doi:10.2174/1381612822666160923.
 58. Kitagawa, D., Gouda, M. & Kirii, Y. Quick evaluation of kinase inhibitors by surface plasmon resonance using single-site specifically biotinylated kinases. *J. Biomol. Screen.* **19**, 453–461 (2014).
 59. Fujita, K.-I., Ishida, H., Kubota, Y. & Sasaki, Y. Toxicities of Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Pharmacotherapy: Management with Clinical Pharmacology. *Curr. Drug Metab.* **18**, 186–198 (2017).
 60. Hartmann, J., Haap, M., Kopp, H.-G. & Lipp, H.-P. Tyrosine Kinase Inhibitors – A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Curr. Drug Metab.* **10**, 470–481 (2009).
 61. Jeon, S. M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* **48**, e245 (2016).
 62. Janzer, A. *et al.* Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10574–10579 (2014).
 63. Chan, D. K. & Miskimins, W. K. Metformin and phenethyl isothiocyanate combined treatment in vitro is cytotoxic to ovarian cancer cultures. *J. Ovarian Res.* **5**, 1 (2012).
 64. Huang, N. L. *et al.* Metformin inhibits TNF- α -induced I κ B kinase phosphorylation, I κ B- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. *Int. J. Cardiol.* **134**, 169–175 (2009).

65. Ersoy, C. *et al.* The effect of metformin treatment on VEGF and PAI-1 levels in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **81**, 56–60 (2008).
66. Lund, S. S. *et al.* Impact of metformin versus repaglinide on non-glycaemic cardiovascular risk markers related to inflammation and endothelial dysfunction in non-obese patients with type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* **158**, 631–641 (2008).
67. Wu, B. *et al.* Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. *Oncol. Rep.* **28**, 903–908 (2012).
68. Fan, C. *et al.* Metformin exerts anticancer effects through the inhibition of the Sonic hedgehog signaling pathway in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* **36**, 204–214 (2015).
69. Vazquez-Martin, A. *et al.* Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle* **9**, 3831–3838 (2010).
70. Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022–1037 (2003).
71. NCI-60 Screening Methodology | NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen | Discovery & Development Services | Developmental Therapeutics Program (DTP). https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm.
72. Huang, S. The war on cancer: Lessons from the war on terror. *Front. Oncol.* **4**, 1–4 (2014).
73. Cane, A., Tournaire, M. C., Barritault, D. & Crumeyrolle-Arias, M. The endogenous oxindoles 5-hydroxyoxindole and isatin are antiproliferative and proapoptotic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 379–384 (2000).
74. Matheus, M. E., Violante, F. de A., Garden, S. J., Pinto, A. C. & Fernandes, P. D. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a

- mouse macrophage cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **556**, 200–206 (2007).
75. Medvedev, A. *et al.* Isatin interaction with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative target of neuroprotective drugs: Partial agonism with deprenyl. *J. Neural Transm. Suppl.* 97–103 (2006) doi:10.1007/978-3-211-33328-0_11.
76. Definición de malato de sunitinib - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute.
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/malato-de-sunitinib>.
77. Avendaño, C. & Menéndez, J. C. *Drugs That Inhibit Signalling Pathways for Tumor Cell Growth and Proliferation. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* (2008). doi:10.1016/b978-0-444-52824-7.00009-3.
78. Kim, Y. S. & Milner, J. A. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 65–73 (2005).
79. Meng, Q. *et al.* Indole-3-Carbinol Is a Negative Regulator of Estrogen Receptor- α Signaling in Human Tumor Cells. *J. Nutr.* **130**, 2927–2931 (2000).
80. Ashok, B. T. *et al.* Abrogation of estrogen-mediated cellular and biochemical effects by indole-3-carbinol. *Nutr. Cancer* **41**, 180–187 (2001).
81. Cram, E. J., Liu, B. D., Bjeldanes, L. F. & Firestone, G. L. Indole-3-carbinol Inhibits CDK6 Expression in Human MCF-7 Breast Cancer Cells by Disrupting Sp1 Transcription Factor Interactions with a Composite Element in the CDK6 Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* **276**, 22332–22340 (2001).
82. Firestone GL, B. L. Indole-3-carbinol and 3-3'-diindolylmethane antiproliferative signaling pathways control cell-cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter- Sp1 transcription factor interactions. *J Nutr* 2448–2455 (2003).
83. Rahman, K. M. W., Li, Y. & Sarkar, F. H. Inactivation of Akt and NF- κ B play

important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutr. Cancer* **48**, 84–94 (2004).

84. Licznarska, B. & Baer-Dubowska, W. Indole-3-Carbinol and Its Role in Chronic Diseases. in *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases* (ed. Publishing, S. I.) vol. 928 267–289 (2016).
85. casini, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. & Supuran, C. Sulfonamides and Sulfonylated Derivatives as Anticancer Agents. *Curr. Cancer Drug Targets* **2**, 55–75 (2005).
86. A Phase II Study of PTS100 in Primary HCC Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03447951>.
87. Indisulam | C14H12ClN3O4S2 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indisulam>.
88. Bramson, H. N. *et al.* Oxindole-based inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2): Design, synthesis, enzymatic activities, and X-ray crystallographic analysis. *J. Med. Chem.* **44**, 4339–4358 (2001).
89. Davis, S. T. *et al.* Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. *Science (80-)*. **291**, 134–137 (2001).
90. Hassan, M., Aboul-Fadl Mohamed Hassan, T., Ahmed Kadi, A. & Abdel-Khader Abdel-Aziz, H. (43) *Pub. Date: Oct. 4, 2012 (54) NOVEL N, N'-HYDRAZINO-BIS-ISATIN DERIVATIVES WITH SELECTIVE ACTIVITY AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT CANCER CELLS.* (2012).
91. Liang, C. *et al.* Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of symmetrical bis-Schiff base derivatives of isatin. *Eur. J. Med. Chem.* **74**, 742–750 (2014).
92. Eldehna, W. M. *et al.* Novel [(3-indolylmethylene)hydrazono]indolin-2-ones as apoptotic anti-proliferative agents: design, synthesis and in vitro biological evaluation. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **33**, 686–700 (2018).
93. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissTargetPrediction: updated data and

- new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.* **47**, W357–W364 (2019).
94. Hanwell, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. ofCheminformatics* **4**, 1–17 (2012).
 95. Rigsby, R. E. & Parker, A. B. Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **44**, 433–437 (2016).
 96. El-Hachem, N., Haibe-Kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H., & Nemer, G. AutoDock and AutoDockTools for Protein-Ligand Docking: Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1(BACE1) as a Case Study. *Neuroproteomics* 391–403 (2017) doi:10.1007/978-1-4939-6952-4_20.
 97. Garrett M. Morris, Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F. Sanner, Richard K. Belew, David S. Goodsell, and A. J. O. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
 98. Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html>.
 99. Riss, T. L. *et al.* *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004).
 100. R. Prakash, C. & Raja, S. Indolinones as Promising Scaffold as Kinase Inhibitors: A Review. *Mini-Reviews Med. Chem.* **12**, 98–119 (2012).
 101. Sánchez-Martínez, C., Gelbert, L. M., Lallena, M. J. & De Dios, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **25**, 3420–3435 (2015).
 102. K. Rathi, A., Syed, R., Singh, V., Shin, H.-S. & V. Patel, R. Kinase Inhibitor Indole Derivatives as Anticancer Agents: A Patent Review. *Recent Pat.*

Anticancer. Drug Discov. **12**, 55–72 (2016).

103. Dhuguru, J. & Skouta, R. Role of indole scaffolds as pharmacophores in the development of anti-lung cancer agents. *Molecules* **25**, (2020).
104. ERBB2 - Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 precursor - Homo sapiens (Human) - ERBB2 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P04626>.
105. CDK2 - Cyclin-dependent kinase 2 - Homo sapiens (Human) - CDK2 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/P24941>.
106. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
107. Daina, A. & Zoete, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* 1117–1121 (2016) doi:10.1002/cmdc.201600182.
108. Katula, K. S. *et al.* Cyclin-dependent kinase activation and S-phase induction of the cyclin B1 gene are linked through the CCAAT elements. *Cell Growth Differ.* **8**, 811–820 (1997).